

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

**HODNOCENÍ ANTIPROTOZOÁLNÍ AKTIVITY
POMOCÍ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS***

(Diplomová práce)

**EVALUATION OF ANTIPROTOZOAL ACTIVITY BY
*TETRAHYMENA PYRIFORMIS***

(Diploma thesis)

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jitka Vytlačilová

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2009

Daniela OSECKÁ

Poděkování:

Děkuji Mgr. Jitce Vytlačilové za její pomoc, odborné vedení, připomínky a cenné rady při vypracování diplomové práce. Děkuji též rodičům za jejich trpělivost a podporu při studiu.

Práce byla podporována grantem GAUK č. 105407.

Diplomovou práci jsem zpracovávala samostatně a všechny zdroje informací jsou citovány v seznamu literatury.

Daniela Osecká

OBSAH

1	ÚVOD	6
1.1	Cíl práce	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Protozoální choroby.....	10
2.1.1	Intestinální a vaginální protozoální infekce	11
2.1.1.1	Améboza.....	11
2.1.1.2	Balantidióza	12
2.1.1.3	Giardióza	12
2.1.1.4	Trichomonóza	13
2.1.2	Krevní a tkáňové protozoální infekce.....	14
2.1.2.1	Leishmanióza.....	14
2.1.2.2	Trypanosomóza	14
2.1.2.3	Toxoplazmóza.....	15
2.1.2.4	Pneumocystóza	15
2.1.3	Malárie.....	16
2.2	Testované látky	17
2.2.1	Albendazol.....	17
2.2.2	Mebendazol	19
2.2.3	Ornidazol	20
2.3	Organismus Tetrahymena spp.	22
2.3.1	Taxonomické zařazení	22
2.3.2	Výhoda pro experimenty.....	24
2.3.3	Růst a výživa	25
2.3.3.1	Živné médium	25
2.3.3.2	Růstová křivka	26
2.3.4	Chemické složky membrány.....	27
2.3.5	Systém endomembrány.....	27
2.3.6	Mitochondrie, peroxisomy, kontraktilní vakuoly	28
2.4	Použité metody	30
2.4.1	Protoxkit F TM	30

2.4.2	Metoda MTT	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1	Materiál.....	32
3.1.1	Použitý organismus	32
3.1.2	Použité pomůcky	32
3.1.3	Použité přístroje.....	33
3.1.4	Použité chemikálie.....	33
3.2	Pracovní postup.....	34
3.2.1	Příprava vzorků	34
3.2.2	Příprava média	35
3.2.3	Příprava suspenze žábronožky	35
3.3	Vlastní provedení a vyhodnocení testů.....	36
4	VÝSLEDKOVÁ ČÁST	39
4.1	Výsledky metody inhibice růstu	40
4.1.1	Albendazol.....	40
4.1.2	Mebendazol.....	43
4.1.3	Ornidazol	45
4.2	Výsledky metody MTT	47
4.2.1	Albendazol.....	47
4.2.2	Mebendazol.....	50
4.2.3	Ornidazol	53
5	DISKUSE	56
6	ZÁVĚR.....	65
7	SEZNAM LITERATURY.....	66
	ABSTRAKT	72

1 ÚVOD

Protozoologie je jedním z oborů lékařské parazitologie, který se zabývá studiem patogenních prvoků, tedy jednobuněčných mikroorganismů (Buchta V., 2000).

Lidské protozoální patogeny způsobují symptomatické i asymptomatické infekce a mohou zasáhnout téměř každého člověka (Khaw M. a kol., 1995). Tito paraziti jsou odpovědní za významnou chorobnost a úmrtnost (Vonlaufen N. a kol., 2008).

Tento důležitý celosvětový dopad nemocí vyplývajících z těchto patogenů se odráží v přetrvávajícím hledání antiprotozoální chemoterapie, která časově předchází moderní dobu. Ale, navzdory růstu antibakteriálních složek v posledních několika desetiletích mnozí argumentovali, že se vývoj efektivní léčby protozoálních infekcí zpožďuje a je komplikovaný složitostí životních cyklů prvoka a interakcemi hostitel – parazit – léčivo a také nízkým ekonomickým podnětem vyvíjet nové látky. Naštěstí ale zvýšené globální cestování a imigrace zvýšily uveřejnění si antiprotozoální lékové rezistence a akutních a opakujících se infekcí u imunosuprimovaných hostitelů, což vedlo k obnovení zajímavé antiprotozoální terapie (Khaw M. a kol., 1995).

Antiprotozoika jsou léčiva používaná k léčbě onemocnění vyvolaných různými druhy patogenních prvoků. Některé protozoální infekce (např. améboza, trichomonóza, toxoplasmóza, kokcidioza) se vyskytují kosmopolitně, jiné (např. malárie, trypanosomóza, leishmanióza) jsou charakteristické pro subtropické a tropické oblasti (Hartl J. a kol., 2006).

Pro celou řadu prvoků je charakteristické, že část jejich životního cyklu probíhá částečně v definitivním hostiteli, kde probíhá pohlavní cyklus a zároveň může být vektorem pro dané onemocnění, a část v mezhospiteli, ve kterém probíhá nepohlavní rozmnožování (Hartl J. a kol., 2006).

Protozoální onemocnění někdy probíhají bez zjevných příznaků nebo mají jen lehký průběh. Infikovaný člověk nebo zvíře může nemoc šířit i jako asymptomatický nosič. Jindy je průběh onemocnění vážný, často s přechodem do chronické formy, celoživotními následky nebo fatálním koncem. Tato onemocnění se často vyskytují u pacientů s oslabenou imunitou (Hartl J. a kol., 2006).

Dělení antiprotozoálních léčiv je v různých zdrojích literatury odlišné. Citovala jsem je ze Základní a aplikované farmakologie pro farmaceuty.

Antiprotozoální látky se dělí na léčiva pro léčbu intestinálních a vaginálních protozoí, a léčiva, která se používají převážně pro léčbu tropických protozoálních chorob, leishmaniózy, trypanosomózy a antimalarika. Do tohoto se řadí i léčiva, která se používají pro léčbu pneumocystózy a toxoplasmózy.

Všechny protozoální choroby je možné tedy rozdělit do tří skupin: intestinální protozoózy - améboza, balantidióza a giardióza, vaginální protozoóza- trichomonóza a krevní a tkáňové protozoózy - leishmanióza, trypanosomóza, toxoplasmóza, pneumocystóza a malárie (Lincová D. a kol., 2007).

V průběhu měření své diplomové práce jsem žábronožku *Tetrahymena pyriformis* vystavila působení tří toxických látek, albendazolu, mebendazolu a ornidazolu.

Mebendazol a albendazol mají také anthelmintickou aktivitu. Používají se tedy pro eliminaci helmintů z organismu. Účinná léčba může být někdy obtížná, v závislosti na životním cyklu parazita. Někteří helminti mají jednoduchý životní cyklus. Celkový vývoj od vajíčka až po dospělého helminta proběhne výhradně v jednom hostiteli, např. v jeho střevě. U jiných je třeba, aby vývoj proběhl nejdříve v jednom nebo

více mezipřehostitelích přes jedno či více morfologických stádií před dosažením dospělosti.

Dělí se na látky proti tasemnicím – anticestodika, látky proti hlísticím – antinematodika a látky proti motolicím – antitreinatodika (Lincová D. a kol., 2007).

1.1 Cíl práce

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na problematiku testování antiprotozoální aktivity tří látek a to albendazolu, mebendazolu a ornidazolu pomocí jednobuněčného organismu *Tetrahymena pyriformis* metodou inhibice růstu Protoxkit FTM a metodou MTT se spektrofotometrickým vyhodnocením na readru a vytvořením růstových křivek, které jsou závislostí růstu organismu na době kultivace a ve vztahu k různým koncentracím testovaných látek.

Cílem mé práce tedy bylo:

- provést rešerši na uvedené téma, zaměřené na testované látky a organismus
- provést vlastní experimenty s jednobuněčným organismem a zároveň zpracovat metodiku testování
- zhodnotit a porovnat dosažené výsledky testů s údaji v odborné literatuře

2 TEORETICKÁ ČÁST

V této kapitole jsem se snažila podat informace o chorobách způsobených parazity, o testovaných látkách a jejich použití, o testovaném organismu *Tetrahymena pyriformis* a o použitých metodách při měření – Protoxkit FTM (základní metoda inhibice růstu) a test MTT.

2.1 Protozoální choroby

Po mnoho let a v mnoha zemích zatěžují zdraví zoonotické nemoci s rezervoárem v domácích i divokých zvířatech, zvláště mezi obrovským množstvím lidí žijících a pracujících ve venkovských oblastech. Dopady na zdraví a socioekonomiku z nemocí způsobených parazity rostou stále více zvláště v rozvojových zemích. Nehledě na to, že způsobují lidskou nemocnost a úmrtnost, také brání zemědělské produkci, snižují použitelnost potravin a tvoří hranici pro mezinárodní obchod. Tento problém nemocí zvířat se šíří z převážně vyhrazených venkovských oblastí a v určitých případech může vzniknout až celosvětová epidemie. K rozšiřování dopadu těchto nemocí přispívají velké pohyby obyvatel, zvýšení obchodování s masem, mlékem a dalšími produkty živočišného původu a také turistika (Solaymani-Mohammadi S. a kol., 2006).

Protozoální choroby se s určitými výjimkami jen zřídka vyskytují v Evropě, avšak vzhledem k vysoké migraci lidí, kteří k nám přicházejí z endemických oblastí, je vhodné, aby o základech terapie těchto chorob byl informován i praktický lékař (Lincová D. a kol., 2007).

2.1.1 Intestinální a vaginální protozoální infekce

Do této skupiny řadíme amébozu, balantidiózu, giardiózu a trichomonózu.

2.1.1.1 Améboza

Amébozu způsobuje patogenní prvok *Entamoeba histolytica*, která je endemická v některých zemích, např. blízké a střední Asie a všude tam, kde je hygiena na nízké úrovni. Vyskytuje se příležitostně i v Evropě, např. u běženců (Lincová D. a kol., 2007).

Tento prvok odhadem nakazí více než 10% populace. Asi 10% infikovaných dostane klinické příznaky – parazit napadne střevní epitel a způsobí amébovou dyzenterii, kolitidu a abscesy v játrech, plicích, mozku a může způsobit až smrt (Khaw M. a kol., 1995).

Ačkoliv *Entamoeba histolytica* nakazila právě 10% obyvatel světa, dva morfologicky identické, ale geneticky odlišné a nepatogenní druhy jsou nyní rozpoznány jako ty, které způsobují nejvíce bezpříznakových onemocnění – *Entamoeba dispar* a *moshkovskii* (Pritt B. S. a kol., 2008).

Rozeznáváme invazivní střevní a mimostřevní amébozu. Nákaza se přenáší cystami, které vylučuje infikovaná osoba stolicí a které kontaminují vodu či potraviny. Střevní améboza se může projevit jako závažná dyzenterie charakterizovaná četnými průjmy s obsahem krve a hnisu. Vždy také hrozí i vznik mimostřevní amébozy, kdy se trofozoity mohou dostat portální krví do jater a způsobit akutní jaterní amébovou hepatitidu, nebo vzácněji se mohou encystovat a vytvořit nebezpečný jaterní amébový absces (Lincová D. a kol., 2007).

2.1.1.2 Balantidióza

Toto onemocnění způsobuje *Balantidium coli*, největší a jediný prvek schopný nákazy člověka (Solaymani-Mohammadi S. a kol., 2006).

Infekce je přenášena potravou, která obsahuje cysty. Z cyst se uvolní trofozoit, který je vybaven cíliemi, proto je pohyblivý a může být vzácně příčinou hluboké ulcerace tlustého střeva. U jinak zdravých pacientů se objevuje občas nauzea, zvracení nebo bolest břicha a průjem. Skutečná dyzenterie se vyskytuje pouze u zeslabených a podvyživených nemocných (Lincová D. a kol., 2007).

Pacienti však mohou zemřít na perforaci střev nebo na dyzenterii s krvácením a šokem podobně jako u *Entamoeba histolytica* (Solaymani-Mohammadi S. a kol., 2006).

2.1.1.3 Giardióza

Giardiózu působí *Giardia intestinalis* (syn. *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*). Infekce způsobená tímto prvokem je charakterizována gastrointestinálními symptomy jako jsou průjmy, které samy zanikají, nebo se vyvíjí chronický epizodický průjem občas spojený s malabsorpcí. Parazit se vyskytuje ve dvou formách: v tenkém střevě většinou ve formě trofozoitu a v dolních partiích střeva ve formě cyst, které jsou vylučovány stolicí (Lincová D. a kol., 2007).

Giardia spp. byla poprvé objevena Leeuwenhoekem v roce 1600 a Vilemem Lamblem roku 1800. Způsobuje průjem celosvětově u trvale žijících obyvatel a u cestovatelů do regionů s fekálně znečištěnou potravou a vodou. Ve Spojených státech amerických je tento prvek nejběžněji identifikovaný intestinální parazit, který odpovídá za 90 průjmových onemocnění propuklých z vody mezi roky 1964 a 1984 (Khaw M. a kol., 1995).

V Peru byli studováni střevní paraziti u dětí pro navržení prevence a kontrolních programů. Bylo zkoušeno 845 dětí. Prevalence enteroparazitů byla 66,3 % a z toho prevalence patogenu *Giardia lamblia* byla 23,8 %. *Giardia* byla nejčastějším parazitem u dětí s průjemovým onemocněním (28,1%) stejně tak jako u dětí bez průjmů (19,5%). Studie molekulární charakterizace tohoto prvoka u dětí potvrdila význam asymptomatických pacientů v přenosu giardiózy, zvláště v místech s nízkou hygienou (Cordón P. G. a kol., 2008) .

Giardia lamblia je jeden z hlavních průjemových činitelů u lidí i zvířat a infekce má hlavní klinicky významný účinek na děti staré pět let a mladší (Adam R., 2001; Thompson R.C.A., 2000).

2.1.1.4 Trichomonóza

Trichomonóza je onemocnění způsobené bičíkovcem *Trichomonas vaginalis*. Tato genitální infekce je mezi dospělou populací velmi častá. U mužů se vyskytuje převážně v asymptomatické formě, kdežto u některých žen může být přítomná vaginitida doprovázená zpěněným světle žlutým výtokem. Pokud nejsou současně léčeni oba partneři, vyskytují se často relapsy (Lincová D. a kol., 2007).

Sutcliffe S. a kolektiv (2006) vedli rozsáhlou studii trichomonóza a náhodně se vyskytující rakovina prostaty. Studie sloužila pro výzkum souvislostí mezi sexuálně přenosnými chorobami a rakovinou prostaty. Většina případů rakoviny byla omezená na orgán. Průměrný věk při diagnóze byl 68,9 let. Doba přežití po diagnóze byla $3,1 \pm 1,7$ let (Sutcliffe S. a kol., 2006).

2.1.2 Krevní a tkáňové protozoální infekce

Do této skupiny se řadí leishmanióza, trypanosomóza, toxoplasmóza, pneumocystóza a zvláštní skupinu tvoří malárie. Leishmanióza a trypanosomóza patří mezi tropické protozoální infekce, se kterými se v Evropě prakticky setkat nemůžeme ani v importovaných případech, protože závažnost těchto onemocnění vylučuje jakékoliv cestování postiženého jedince. Toxoplasmóza, pneumocystóza a malárie jsou parazitózy, které se i v Evropě vyskytovat mohou (Lincová D. a kol., 2007).

2.1.2.1 Leishmanióza

Leishmaniózy jsou parazitární infekce vyvíjející se po nákaze prvky rodu *Leishmania*, které se na člověka přenáší komárky rodu *Phlebotomus* (Lincová D. a kol., 2007).

Spektrum klinických syndromů způsobených *leishmaniemi* zahrnuje místní infekce kůže, podkožních tkání a oblasti lymfatických uzlů - kožní forma, infekce úst a nosu - mukokutánní projevy a rozptýlenou infekci zahrnující viscerální orgány – viscerální typ onemocnění (Khaw M. a kol., 1995).

2.1.2.2 Trypanosomóza

Lidská africká trypanosomóza je systémová infekce centrálního nervového systému, kterou působí dva geograficky odlišné druhy trypanosom (Khaw M. a kol., 1995). *Trypanosoma brucei gambiense* vyvolává delší průběh nemoci a *Trypanosoma brucei rhodesiense* vyvolávající akutní onemocnění většinou končící smrtí. Přenáší se slinami mouchy tse-tse. Klinickou formou je spavá nemoc. Počáteční příznaky jsou nespecifické, po nich se vyvíjí tzv. meningoencephalitis lethargica (Lincová D. a kol., 2007).

Prvok *Trypanosoma cruzii* působí jihoamerickou trypanosomózu, po nákaze se vyvine Chagasova nemoc. Vektorem v tomto případě není moucha ale ploštice rodu *Triatoma*, k přenosu dojde sterkorálně. Nastane postižení trávicího ústrojí a následně myokardu, kdy se vyvíjí kardiomyopatie, která pokud není léčená může být smrtelná (Lincová D. a kol., 2007).

2.1.2.3 Toxoplazmóza

Toto onemocnění je způsobeno intracelulárním prvokem *Toxoplasma gondii*. Může se přenášet kongenitálně, u získané formy většinou ústy. Klinickým projevem může být kongenitální, oční, lymfadenopatická forma nebo jako neurotoxoplazmóza, která se vyskytuje zvláště u pacientů s onemocněním AIDS (Lincová D. a kol., 2007). Po akutní fázi infekce mají infikované tkáně cysty 10 až 200 μm v průměru, nejčastěji lokalizované v myokardu, kosterním svalu a CNS. Reaktivace chronické infekce z latentních cyst nastává téměř výhradně u pacientů s imunosupresí (Khaw M. a kol., 1995).

2.1.2.4 Pneumocystóza

Nebo také pneumocystová pneumonie je onemocnění způsobené mikroorganismem *Pneumocystis carinii*. Je to jedna z nejčastějších infekcí, která se vyskytuje u pacientů s AIDS (Lincová D. a kol., 2007).

2.1.3 Malárie

Malárie je onemocnění způsobené patogeny napadajícími červené krvinky. Každý rok se celosvětově odhaduje asi 120 milionů klinických případů malárie, které mají za následek více než 1 milion smrtí (Khaw M. a kol., 1995).

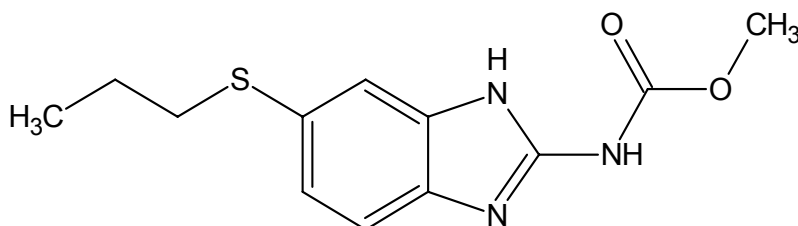
Pro člověka jsou patogenní 4 druhy malarických plazmodií: *Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. falciparum* a *P. malariae* (Lincová D. a kol., 2007). Plasmodia získávají základní aminokyseliny z degradace hemoglobinu červenýchrvinek hostitele (Goldberg D.E. a kol., 1991). Vyvolává potenciálně smrtící infekci. Následkem toho pacienti musí získat okamžitou lékařskou pomoc (Khaw M., 1995).

2.2 Testované látky

Benzimidazolová anthelmintika albendazol a mebendazol mají jen omezenou rozpustnost ve vodě. Malé rozdíly v rozpustnosti mohou mít významný vliv na absorpci a farmakokinetické vlastnosti. Rozpouští se v tekutině gastrointestinálního traktu, dojde k absorpci přes mukózu a tak dosáhnou krevního řečiště a trvalé koncentrace v prostředí kolem parazita (Lanusse C.E. a kol., 1993).

Nitroimidazolové deriváty (ornidazol) jsou látky, které se velice dobře vstřebávají, téměř se 100% biologickou dostupností a výborným průnikem do tělesných tekutin a tkání (Lincová D. a kol., 2007).

2.2.1 Albendazol



Sumární vzorec: $C_{12}H_{15}N_3O_2S$

Albendazol se řadí mezi benzimidazolové deriváty. Chemicky je to methyl-N-[5-(propylsulfanyl)-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát. Jeho mechanismus účinku spočívá v blokádě příjmu glukosy a snížené tvorbě glykogenu a ATP (Hartl J. a kol., 2006), dochází tak k degeneraci mikrotubulů střevních buněk (Lincová D. a kol., 2007). Albendazol je širokospektré anthelmintikum, které je jako jediné účinné proti všem vývojovým stádiím helmintů-vajíčkům, larvám i dospělcům (Lincová D. a kol., 2007).

Benzimidazolová anthelmintika se chemicky řadí mezi thiole, halogenované benzimidazoly, pro-benzimidazoly a metylkarbamáty (Lanusse C.E. a kol., 1993). Albendazol jako benzimidazolový metylkarbamát

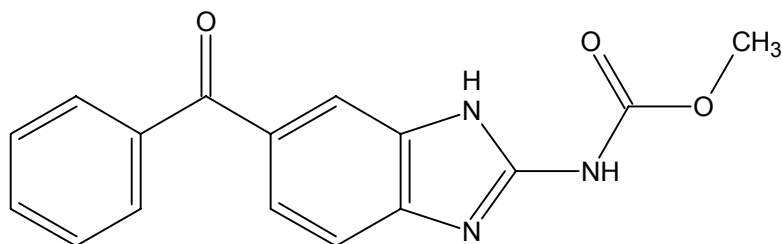
se používá k léčbě lidské cystické echinokokózy. Ve studii na myších byl albendazol zkoušen ve dvou různých formulacích, jako roztok a jako suspenze (Ceballos L. a kol., 2008). Toto chronické onemocnění způsobuje *Echinococcus granulosus*, který je zodpovědný za celosvětovou nemocnost i úmrtnost (Budke C.M. a kol., 2004). Albendazol se prokázal jako cenná látka při odstraňování cyst, protože snižuje jejich životaschopnost (Falagas M.E. a kol., 2007). Od roku 1980 se albendazol používá k léčení této nemoci a je to lék s relativně nízkou toxicitou. U pacientů dlouhodobě léčených albendazolem je nutné sledovat jaterní enzymy, zvláště pokud je vyloučena radikální operace nebo pro prevenci sekundární echinokokózy (Nuray A. a kol., 2007).

Albendazol byl zkoušen jako léčivo na neurocysticercózu. Cílem studie bylo zhodnotit jeho účinky na mizení cyst, snížení jejich počtu a návratu záchvatů (Carpio A. a kol., 2008). Infekce je způsobená larválním stádiem tasemnice *Taenia solium*, která způsobuje nejčastější parazitární infekci lidské CNS (White A., 2000;). Klinickými projevy jsou záchvaty, bolest hlavy a neurologické deficity (White A., 2000; Carpio A. a kol., 2002). Onemocnění způsobuje zdravotní problémy pro většinu rozvojových zemí, zemí s vysokou imigrací z endemických oblastí v Latinské Americe, Asii a Africe (Carpio A. a kol., 2002). Po terapii albendazolem bylo do jednoho měsíce 31% pacientů bez aktivních cyst. Navíc tato skupina vykazovala větší snížení počtu těchto aktivních cyst v porovnání se skupinou, která dostávala placebo. Ovšem menší účinek mělo použití albendazolu na cysty ve stádiu kalcifikací (Carpio A. a kol., 2008).

V další studii byl albendazol zkoušen jako léčivo pro humánní toxokarózu, která je způsobena infekcí larválními stádii parazitů psů a koček, *Toxocara canis* a *Toxocara cati*. U pacientů se toxokaróza projevuje eosinofilií a záchvaty nejistého původu, dále může vzniknout hepatomegalie a splenomegalie, bronchospazmus a kožní vyrážka. Všichni pacienti byli léčeni orálně albendazolem 15mg/kg po dobu osmi dní. Bylo zjištěno rychlé zlepšení symptomů a laboratorních nálezů a nebyly prokázány žádné vedlejší účinky (Saporito L. a kol., 2008).

Albendazol je látka, která se velmi málo vstřebává z trávicího ústrojí. Pokud se ale do organismu dostane, velice dobře se distribuje. Dostává se do nitra cyst i do likvoru (Lincová D. a kol., 2007).

2.2.2 Mebendazol



Sumární vzorec: C₁₆H₁₃N₃O₃

Chemicky se jedná o sloučeninu methyl-N-(5-benzoyl-1H-benzimidazol-2-yl)karbamát. Jeho mechanismus účinku je stejný jako u albendazolu (Hartl J. a kol., 2006). Váže se na tubulin savců i parazitů. Parazité nemetabolizují tuto látku tak rychle jako savci (Lincová D. a kol., 2007).

Mebendazol je obecně užíváný pro léčbu helmintóz u lidí a zvířat (Martarelli D. a kol., 2008) a pro léčbu enterobiázy (Cañete R. a kol., 2009). Užívá se celosvětově pro svoji nízkou absorpci ze střeva a své široké spektrum účinku proti helmintům i v nárazových dávkách (Cañete R. a kol., 2009). Cañete R. a kol. (2006) potvrdil ve své studii účinnost mebendazolu pro léčbu lidské giardiózy u dětí a to v menších léčivých dávkách než se očekávalo (Cañete R. a kol., 2006).

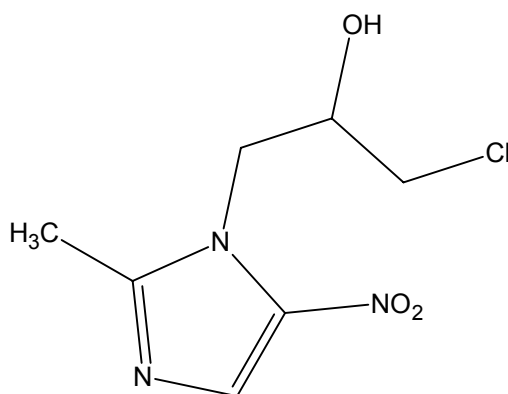
Nedávno byl dokázáný efekt pro inhibici růstu různých rakovinných buněk in vitro a in vivo (Mukhopadhyay T. a kol., 2002). Studie potvrdily protinádorové účinky mebendazolu díky indukci apoptózy na rakovinné buňky, ale inhibice angiogeneze prokázaná nebyla (Martarelli D. a kol., 2008). O tyto nálezy se opírá studie efektů mebendazolu na lidský adrenokortikální karcinom in vitro a po implantaci v nahých myších. Je to

vzácný nádor nadledvin, který vyžaduje novou terapii, ranná diagnóza je obtížná a prognóza špatná. Celkově data z této studie ukazují, že použití mebendazolu, a také v kombinaci se standartní terapií může poskytnout nový protokol pro inhibici růstu tohoto tumoru (Martarelli D. a kol., 2008).

Mebendazol byl dále zkoumán jako léčivo pro pacienty s metastázami melanomu, kteří nereagovali na dostupnou terapii. Byl upřednostňován pro svůj výhodný farmakokinetický profil inhibovat růst melanomu (Doudican N. a kol., 2008). Ukazuje potenciál pro efektivní terapii melanomu, ale k tomu je nezbytný předpoklad studie v živém organismu. Vzhledem ke studiím, které ukazují inhibici nádorového růstu v plicích a nadledvinách se dá naznačit, že bude efektivní i proti zhoubnému melanomu (Mukhopadhyay T. a kol., 2002).

Léčení pomocí mebendazolu se ukázalo jako vysoce efektivní také u roupových infekcí způsobených hlísty *Dipylidium caninum*. Protože je to ale velice běžná opakovaná a perzistentní infekce, musí následovat vhodná laboratorní diagnóza (Samkari A. a kol., 2008).

2.2.3 Ornidazol



Sumární vzorec: $C_7H_{10}ClN_3O_3$

Ornidazol patří mezi nitroimidazolové deriváty s antiprotozoální aktivitou (Hartl J. a kol., 2006). Chemicky se jedná o nitroimidazolový derivát

[1-(3-chloro-2-hydroxypropyl)-2-methyl-5-nitro]imidazol (Declerck P.J. a kol., 1983). Jeho mechanismus účinku je inhibice replikace DNA mikroba (Lincová D. a kol., 2007).

Nitroimidazolové deriváty bývají užívány v léčení protozoálních a anaerobních infekcí.

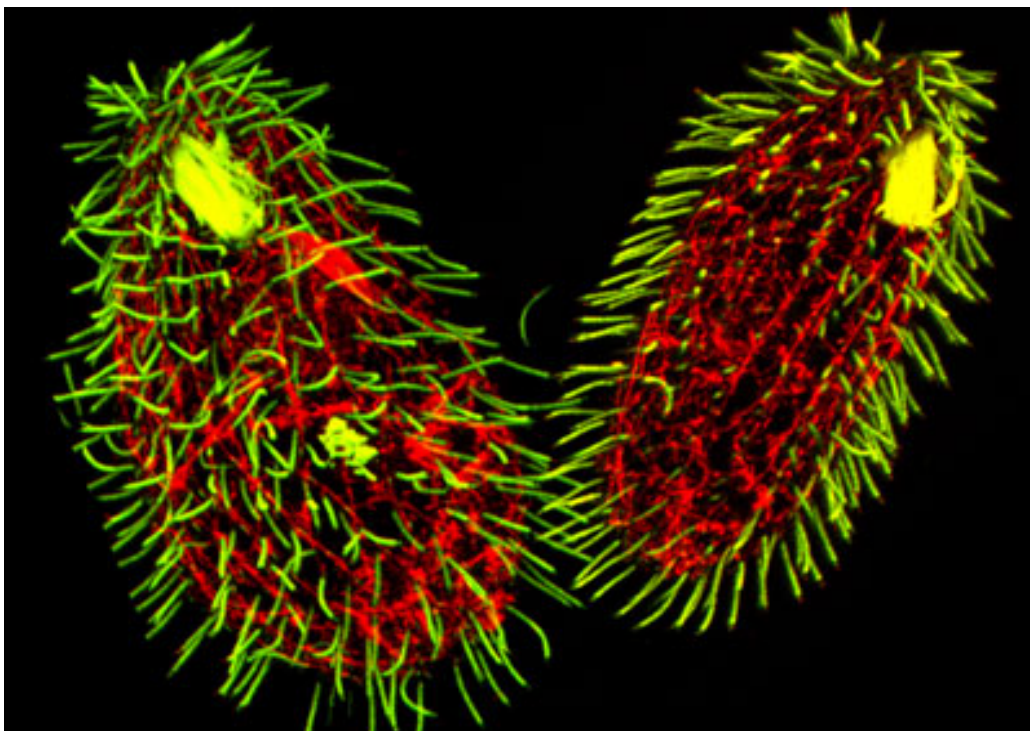
Ornidazol je užíván v léčení jaterní a střevní amébozy, giardiózy, trichomonózy urogenitálního traktu a bakteriálních vaginóz (Edwards D.I., 1986).

Zprávy o jejich hepatotoxicitě jsou vzácné. Ale ukazuje se případ prudké hepatitidy po dlouhodobém podávání ornidazolu speciálně u žen. Pacientkám (27 let) byl podáván 8 týdnů dvakrát denně ornidazol pro léčbu intestinální amébozy. Po určité době se ale hodnoty jaterní transaminázy snížily a hodnoty bilirubinu se zvýšily a proto se provedla biopsie jater. Histopatologická zkouška prokázala nálezy, které indikují prudkou hepatitidu (Harputluoglu M.M.M. a kol., 2007).

Ornidazol byl velice dobře tolerován ve studii na léčbu revmatoidní artritidy. Během zkoušky se jevil jako bezpečný a spojený se zlepšením zánětlivých symptomů onemocnění. Došlo ke snížení bolesti a délky ranní ztuhlosti a k významnému zvýšení kvality života nemocných. Může být tedy efektivní léčbou, která je ekonomicky srovnatelná s ostatními (Ogrendik M., 2006).

Účinnost a bezpečnost ornidazolu byla zkoumána pro prevenci návratu Crohnovy nemoci po resekci tenkého střeva v placebem kontrolované dvojité zaslepené studii. Ornidazol prokázal efektivní profylaxi po operaci Crohnovy nemoci, klinickému návratu u pacientů zabránil o 1 rok (Rutgeerts P. a kol., 2005).

2.3 Organismus *Tetrahymena* spp.



Obr. 1: *Tetrahymena thermophila* (zvětšeno 1500x), Dr. Marie – Héléne Bré, Laboratory of cellular Biology University of Paris, South Orsay, France, Honorable Mention, 2005

Zdroj: www.nikonsmallworld.com

2.3.1 Taxonomické zařazení

Říše: *Protozoa* (prvoci)

Tato říše zahrnuje jednobuněčné, vzácně i jednoduché vícebuněčné organismy s chemoheterotrofní, tedy s osmotrofní, fagocytární nebo parazitickou výživou. V současné době jsou mezi prvoky řazeny i skupiny, které dříve patřily mezi rostliny nebo houby. Z fylogenetického hlediska se nejedná o jednotnou skupinu, proto systematika prvoků není ustálená a

může docházet k začlenění některých organismů do jiných říší. To ale musí být podloženo ultrastrukturálními a molekulárními znaky (Rosypal S., 2003).

Prvoci získávají energii převážně oxidativní fosforylací při buněčném dýchání v mitochondriích (Sedlák E., 2002).

Podříše: *Alveolata*

Podříše *Alveolata* zahrnuje prvoky s maximální strukturní složitostí dosažitelnou jednobuněčnými organismy, a to nálevníky (*Ciliophora*), obrněnky (*Dinzoa*) a parazitické výtrusovce (*Sporozoa*, syn. *Apicomplexa*) (Rosypal S. a kol., 2003).

Kmen: *Ciliophora* (nálevníci)

Tato skupina představuje vrchol složitosti buňky heterotrofních prvoků (Rosypal S. a kol., 2003).

Nálevníci mohou žít volně ve vodě nebo vlhkém prostředí nebo parazitují. Vodní druhy jsou důležitou součástí potravních řetězců a mnoho jich je využíváno jako bioindikátorů znečištění. Také se mohou encystovat a díky tomu se kosmopolitně rozšířit (Sedlák E., 2002).

Třída: *Oligomenophorea* (chudoblanní)

U těchto nálevníků se brvy u cytostomu (komplex potravních organel – buněčná ústa) výrazně liší od brv somatických. Membranely sloužící k přihánění potravy jsou ještě málo vytvořené nebo je buňka bez nich (Sedlák E., 2002).

Řád: *Hymenostomatida*

Okolo cytostomu mají v bukalní prohlubni několik membranel. Vlastní buňka je pokryta početnými somatickými brvami (Sedlák E., 2002).

Rod: *Tetrahymena*

Druh: *Tetrahymena pyriformis*

Lidé jsou vystaveni různým chemikáliím a jejich kombinacím. Takže test toxicity se stal základním kamenem odhadu chemického rizika. Testování chemických látek je výhodnější na mnohobuněčných zvířecích modelech, ale i přesto by mělo být v rámci screeningu provedeno také na méně složitých jednobuněčných organismech (Mumtaz M.M. a kol., 2000). Na prvokovi *Tetrahymena pyriformis* byla studována toxicita různých substancí (Stefanidou M. a kol., 2008). *Tetrahymena* je více než čtyřicet let organismus volby při různých zkouškách. Rozsáhlé používání tohoto nálevníka jako zkušebního organismu se váže k dobře se rozrůstajícím kulturám s krátkou dobou potřebnou pro rozdělení buňky a obsáhlým znalostem jeho biochemie a morfologie (Nilsson J.R., 1989).

2.3.2 Výhoda pro experimenty

Tetrahymena pro experimenty nabízí několik výhod. Je to velká, pohyblivá buňka usnadňující morfologické pozorování a levná kultura, která vykazuje za příznivých laboratorních podmínek rychlé buněčné dělení. Její vynikající vlastností je přítomnost dvou druhů jader uvnitř každé buňky. Diploidní mikrojádru je transkripčně inaktivní a nese zárodek. Somatické makrojádru obsahuje asi 45 kopií každého vyjádřeného genu a určuje genotyp buňky. Během vegetativního růstu se

mikrojádru dělí mitózou, zatímco makrojádru se dělí amitoticky na dvě jádra během cytokineze (Asai D.J. a kol., 2000).

Představuje model eukaryotické buňky. Jedná se o nálevníka o rozměrech asi 50µm na délku a 20µm na šířku (Asai D.J. a kol., 2000).

2.3.3 Růst a výživa

Tetrahymena může růst velmi dobře v různých mediích. Kultury rostou rychle geometrickou řadou a mohou dosáhnout hustoty až 1×10^6 v mililitru. Studie ukázala, že *Tetrahymena* vyžaduje 11 základních aminokyselin, 6 esenciálních vitamínů B-komplexu, kyselinu lipoovou, Fe^{3+} , 5 dalších stopových prvků, z purinů preferuje guanin a z pyrimidinů uracil a nemá žádné požadavky na steroly (Asai D.J. a kol., 2000).

Organismus *Tetrahymena* má dvě účinné cesty absorpce živin: fagocytózou substance a aktivním transportem živin v roztoku (Asai D.J. a kol., 2000).

V průběhu dlouhodobého uchovávání nálevníci vyžadují, aby byl růst minimalizován nebo omezen. Prodlužovaný růst vede k degradaci kmene (Asai D.J. a kol., 2000).

2.3.3.1 Živné médium

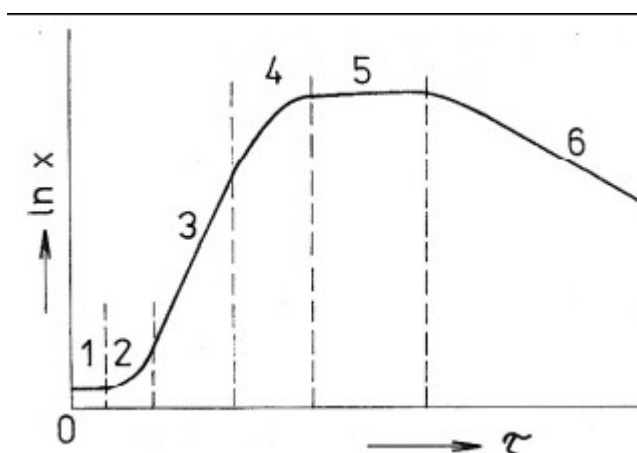
K výrobě média by se měla používat destilovaná voda vysoké čistoty a skleněné jednoúčelové nádoby, protože buňka je velice citlivá na nečistoty. Tradičním základem je proteózní pepton. Růst je limitován železem, to může být dodáváno obohacené o sůl, chelátové soli nebo kvasinkový extrakt (Asai D.J. a kol., 2000).

Existuje mnoho odchylek, vyrábí se další chemicky modifikovaná média, bakterizovaná a hladovící (Asai D.J. a kol., 2000).

2.3.3.2 Růstová křivka

Růstová křivka má 6 fází:

- I. LAG FÁZE – adaptace na nové prostředí kdy se buňka nemnoží, ale vytváří energii, starší buňky odumírají
- II. FÁZE ZRYCHLENÉHO RŮSTU – kultura je plně přizpůsobená, buňka se množí a je velice citlivá na negativní vlivy prostředí, je zvýšená intenzita metabolismu
- III. EXPONENCIÁLNÍ FÁZE – intenzivní množení, počet buněk roste geometrickou řadou, rychlé využívání substrátu, rychlost dělení je konstantní, úhyn je minimální
- IV. FÁZE ZPOMALENÉHO RŮSTU – nízké množení i celkový metabolismus, vyčerpání živin a hromadění metabolitů → nízká rychlost dělení
- V. STACIONÁRNÍ FÁZE – nedostatek prostoru, natalita=mortalita
- VI. FÁZE POKLESU – zrychlené odumírání, mortalita je mnohem vyšší než natalita, nulová rychlost dělení



(Buchta V. a kol., 2000)

2.3.4 Chemické složky membrány

Z lipidů *Tetrahymena* obsahuje fosfolipidy a fosfonolipidy, které obsahují fosfor. Fosfonolipidy jsou resistantní vůči enzymatické degradaci a mohou tento organismus udělat resistantní vůči fosfolipáze. Také obsahuje velké množství pentacyklických triterpenoidů, zvaných tetrahymanoly. Membrána obsahuje dále inositol fosfolipid a sfingolipidy. Ty jsou důležité pro přenos zakotvených proteinů k povrchu buňky (Asai D.J. a kol., 2000).

Z proteinů se zde nacházejí glykoproteiny, jsou to i-antigeny, které jsou fixovány na buněčném povrchu. Další jsou H-antigeny, kyselé proteiny s molekulovou hmotností 44-52 kDa s vlastností opakovat přerušené cysteinové zbytky v definovaných pozicích. Studie ukazují, že tyto proteiny kotví k buněčnému povrchu glykosyl-fosfatidylinositol (GPI) (Asai D.J. a kol., 2000).

Tetrahymena má negativní vnitřní klidový potenciál založený na rovnováze přestupu K^+ přes membránu. Vyjadřuje klasický řasový zvrát, který je odjištěný vstupem Ca^{2+} iontů přes napěťově řízené vápenaté kanálky. *Tetrahymena* vykazuje orientaci chemokineze směrem k chemoatraktantům a vyhne se chemorepelantům.

V buňce jsou přítomny cyklický AMP a cyklický GMP. Cyklický AMP fosforyluje lehké řetězce polypeptidů (Asai D.J. a kol., 2000).

V *Tetrahymena* byl objeven protein kalmodulin. Jedná se o protein, který aktivuje ATP-asu, reguluje guanylát cyklamátovou aktivitu a prostupnost Ca^{2+} iontů a také fosforylaci β -tubulinu (Asai D.J. a kol., 2000).

2.3.5 Systém endomembrány

Všechny součásti jsou vzájemně propojené.

Tetrahymena má všechny varianty endoplazmatického retikula – ribosomální (drsne), hladké a zvláštní „bifaciální“ s ribozomy na jedné

straně a hladké na straně druhé. Drsné endoplazmatické retikulum je obvykle spojeno s mitochondrií. Endoplazmatické retikulum *Tetrahymena* je pravděpodobně skladovacím prostorem Ca^{2+} iontů. Byla pozorována četná shromáždění malých váčků a měchýřků spojené s cisternami endoplazmatického retikula vykazující všechny strukturální charakteristiky Golgiho aparátu. V kůře byly nalezeny diktyosomy spjaté s vnějšími mitochondriemi (Asai D.J. a kol., 2000).

Tetrahymena vytváří velké potravní vakuoly a jejich zbývající obsah vyprazdňuje ve specializovaných „cytoproctech“. Potravní vakuoly jsou okyselené a obsahují dostatek kyselých hydroláz, tím je povoleno trávení makromolekul v potravě (Asai D.J. a kol., 2000).

Plazmatická membrána *Tetrahymena spp.* pokrývá alveolární membránu, to zahrnuje invaginaci, která proniká kortikálními alveoly a skeletem membrány. Tyto invaginace se tradičně nazývají „parosomální vaky“, u *Tetrahymena pyriformis* bývají na straně cytoplazmy připomínající pokryté póry. Jsou to jediná místa kde je plazmatická membrána v normálním kontaktu s vnitřní cytoplazmou (Asai D.J. a kol., 2000).

V *Tetrahymena spp.* byly charakterizované lysozomy jako různorodá směs obsahující kyselé hydrolázy. Lysozomální enzymy byly identifikované na dvou místech, v potravní vakuole (technické a fagolysozomy) a enzymy vázané na vnější povrch membrány. Také byly objeveny malé lysozomální váčky, které by měly být klíčem pro intracelulární trávení a sekreci trávicích enzymů (Asai D.J. a kol., 2000).

2.3.6 Mitochondrie, peroxisomy, kontraktilní vakuoly

Tetrahymena dýchá aerobně (za přítomnosti vzduchu) pomocí mitochondrií, v nichž jsou lokalizovány dýchací enzymy. Mitochondrie jsou přítomné všude v cytoplazmě, koncentrované v povrchové vrstvě buňky. Mají charakteristické vlastnosti mnoha jiných skupin jednobuněčných

eukaryot. Mitochondriální DNA *Tetrahymena pyriformis* je lineární molekula, kompletně uspořádaná s 47,172 páry bazí (Asai D.J. a kol., 2000).

Peroxisomy jsou zajímavou organelou. Jsou menší než mitochondrie, vázané na jedinou membránu a mají hustý zrnitý vnitřek. Peroxisomy jsou místem β -oxidace mastných kyselin a enzymů glyoxylátového cyklu. Umožňují tak organismu efektivně přeměňovat lipidy na glykogen (Asai D.J. a kol., 2000).

Kontraktilní vakuola je část systému s třemi složkami. Jsou to obvykle dva průduchy stažitelné vakuoly, jedna vlastní stažitelná vakuola a okolní systém specializovaných rourek zvaných „spongiomy“ (Asai D.J. a kol., 2000).

2.4 Použité metody

Pro naměření diplomové práce jsem použila dvě metody. Jedná se o základní metodu Protoxkit FTM – měření inhibice růstu a test MTT.

2.4.1 Protoxkit FTM

Metoda se používá u nálevníků, kteří jsou udržováni na živu při pokojové teplotě několik měsíců ve velmi specifickém médiu (Protoxkit FTM, 1998).

Je to multigenerační biologická zkouška růstové inhibice s prvkem *Tetrahymena pyriformis*. Tento 24 hodinový test je založený na přeměně substrátu (potravinové suspenze) v biomasu nálevníka. Zatímco normálně se množící kultury vyjasní substrátovou suspenzí během 24 hodin, inhibovaný růst v kulturách se odráží kalností (Webb S.R., 2001). Měření optické hustoty zákalu kvantitativně určí stupeň inhibice. Test je dokončený po 24 hodinách, během této doby vznikne 5-6 generací prvoka (Protoxkit FTM, 1998).

Každá chemikálie musí být zkoušena nejméně třikrát. Z toxikantů se připravují zásobní roztoky v deionisované vodě. pH se může upravit pomocí HCl nebo NaOH na rozmezí 5,5-8,0 (Jawecki G.N. a kol., 2003).

V laboratoři se tento test provádí v mikrotitračních destičkách s vyhodnocením optické hustoty na readru. Inhibice růstu je pozorována po 24 hodinách (Protoxkit FTM, 1998).

2.4.2 Metoda MTT

MTT je rychlá a citlivá kvantitativní spektrofotometrická zkouška pro určování životaschopnosti v jednoduché kultuře buněčné linie

s konkrétním využitím v normálních a lékově resistantních buněčných liniích. Zkouška zahrnuje přeměnu tetrazoliových solí MTT množící se buňky na nerozpustný produkt. Výhodou této metody je, že vyžaduje méně buněk než standardní test cytotoxicity (Edmondson J.M. a kol., 1988).

Metoda využívá redukci MTT barviva. Jedná se o (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid (Dias N. a kol., 1999). MTT je redukován uvnitř životaschopných buněk na nerozpustný barevný formazanový produkt mitochondriálními dehydrogenázami. V různých buněčných liniích přes 50% barviva může pronikat přes buněčnou membránu, potom bývá redukován nemitochondriálními, cytosolickými a mikrosomálními enzymy (Jaszczyzyn A., 2008). Formazanové krystaly mohou být buď pozorované mikroskopicky v buněčné cytoplazmě nebo extrahované a rozpuštěné v organických rozpouštědlech, jako je DMSO, dovolující spektrofotometrické kvantitativní stanovení (Mossman T., 1983).

Tetrahymena pyriformis byla použita pro optimalizaci testu v rámci koncentrace barviva MTT a inkubační doby a pro odhad životaschopnosti prvoků vystavených jedovatým látkám (Dias N. a kol., 1999).

Pro každou testovanou látku se zkouška opakuje třikrát.

Metoda MTT se v současné době využívá hlavně v oblasti testování s rakovinnými buňkami.

Onkologické nemoci jsou hlavní příčinou úmrtnosti v rozvinutých zemích. V současné době proces vybírání chemoterapie představuje metodu pokusů a omylů zanedbávající biologickou individualitu nádoru. Zlepšení výsledků se očekává od testování citlivosti léčiv ex vivo, které pak dovolí vybrat co nejúčinnější léčivo pro konkrétního pacienta. Mezi aktuální metody patří i MTT metoda, jedna z hlavních technik testování nádorové buněčné rezistence. Metoda je rychlá, bezpečná a objektivní u pacientů s leukémií a lymfomem. Tato zkouška dala rychlé a reprodukovatelné výsledky s důležitou klinickou významností, ale neposkytuje žádné informace o molekulárním mechanismu lékové rezistence (Hatok J. a kol., 2009).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použitý organismus

Pro tyto toxikologické testy jsme použili zásobní kulturu *Tetrahymena pyriformis*, která byla získaná ze spolupracujícího pracoviště parazitologického oddělení přírodovědecké fakulty UK. Oproti *Tetrahymena thermophila* dává lepší výsledky, má výraznější růstovou křivku.

Organismus *Tetrahymena pyriformis* nekonjuguje (ve svém životním cyklu nemá pohlavní období) a má mnohem jednodušší synchronizaci buněčného dělení (Asai D.J. a kol., 2000). Medium pro růst kultury je známé jako PPY="Proteose Pepton Yeast extrakt".

3.1.2 Použité pomůcky

Zkumavky se zábrusem

Stojan na zkumavky

Laboratorní lžičky

Lodička

Kádinka

Automatické mikropipety a špičky 20-200µl; 50-200µl; 100-1000µl; 0,5-5,0µl

Mikrotitrační destičky s 96 jamkami

3.1.3 Použité přístroje

Analytické digitální váhy KERN ABJ

Předvážky KERN 440-47N

Inkubátor AQUALYTIC

Laminární box AURA 2000 M.A.C

Reader ANTHOS 2010, software verze 2.3

Ultrazvuková lázeň SONOREX DIGITAL 10P

Autokláv (SMALL-BATCH STERILIZER) Type KL and TKL - MCS

Počítač ANTHOS 2010, software verze 1.7

Třepačka VORTEX-GENIE 2

3.1.4 Použité chemikálie

Albendazol (Mr=265,34) SIGMA v koncentracích 0,8333mmol/l;
0,41667mmol/l; 0,20833mmol/l; 0,104166mmol/l; 0,05208mmol/l

Mebendazol (Mr=295,3) SIGMA v koncentracích 0,41667mmol/l;
0,20833mmol/l; 0,104166mmol/l; 0,05208mmol/l; 0,02604mmol/l

Ornidazol (Mr=219,6) SIGMA v koncentracích 0,8333mmol/l;
0,41667mmol/l; 0,20833mmol/l; 0,104166mmol/l; 0,05208mmol/l

Dichroman draselný v koncentracích 0,1648 mmol/l; 0,0412 mmol/l;
0,0103 mmol/l; 0,0026 mmol/l; 0,0006 mmol/l

Vodný roztok MTT (10mg/1ml) pouze pro test MTT = 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid , approx.98% TLC, SIGMA, Mr=414,33

Dimetylsulfoxid (DMSO) 99,5% FLUKA, Mr=78,13

Destilovaná voda

Kvasnicový extrakt FLUKA, složení: masový extrakt 3g/l

želatinový pepton (pankreatický) 5g/l

dusičnan draselný 5g/l

hydrogenfosfát disodný 2,5g/l

galaktosa 5g/l

agar 3g/l

pH 7,4±0,2

PPY živné médium FLUKA, složení: aminodusík >3%

celkový dusík >11%

rezidua po spálení <20%

zbytky po sušení <6%

pH 6,0 – 8,0

75% Ethanol k povrchové desinfekci rukavic před prací v laminárním boxu

3.2 Pracovní postup

Postup u obou metod se liší pouze přidáním barviva MTT a rozpouštědla DMSO u testu MTT a způsobem vyhodnocení. Použité pomůcky a testované látky se neliší, zůstávají stejné i koncentrace testovaných látek.

3.2.1 Příprava vzorků

Připravili jsme si koncentrační řadu, tedy 5 klesajících koncentrací testované látky půlkovým ředěním. Nejvyšší koncentrace byla 2,5mmol/l (pouze u mebendazolu je první nejvyšší koncentrace 1,25mmol/l díky jeho špatné rozpustnosti). Příslušné množství testované látky v nejvyšší

koncentraci jsme rozpustili v odpovídajícím množství destilované vody ve zkumavce se zábrusem. Každá další koncentrace pak vznikla naředěním předchozího destilovanou vodou o polovinu. Z důvodu špatné rozpustnosti testovaných látek jsem přidali příslušné množství 2% rozpouštědla DMSO a rozpouštěcí proces jsme urychlovali rozpouštěním v ultrazvukové lázni.

Testované látky byly testovány v koncentraci mmol/l.

3.2.2 Příprava média

Médiem je PPY skládající se z 1,5% peptonu a 0,025% kvasnicového extraktu vysterilizovaného v autoklávu po dobu 20min, při teplotě 121°C a tlaku cca 100kPa.

3.2.3 Příprava suspenze žábřonožky

Suspenzi *Tetrahymena spp.* pro konkrétní test jsme předkultivovali pro získání dostatečného množství a optimální hustoty organismů v živném médiu 18 až 20 hodin před začátkem experimentu.

3.3 Vlastní provedení a vyhodnocení testů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
C	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
D	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
E	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
F	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
G	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Mikrodestička obsahuje 96 jamek. Při plnění zůstávají sloupce 1, 3, 5, 7, 9, 11 a 12 prázdné kvůli dostatku vzduchu pro testovaný organismus. Ve sloupcích 2, 4, 6, 8 a 10 je v řadě B samotné testovací médium (pepton), v řadě C je médium se vzorkem a v řadě D kontrola (pouze suspenze *Tetrahymena pyriformis* se živným médiem). V ostatních řadách je 5 klesajících koncentrací testovaných látek s tím, že nejvyšší koncentrace jsou v jamkách E2, F2 a G2.

Schéma dávkování jamek mikrotitrační destičky:

	Pepton 1,5%	180μl
	Pepton + látka	120 + 60μl
	Pepton + <i>Tetrahymena</i>	120 + 60μl
Paralelní stanovení	1.	60+60+60μl
	2.	60+60+60μl
	3.	60+60+60μl

Test inhibice růstu:

Optickou hustotu jsme pro každou testovanou látku na readru změřili třikrát v časech 0, 1 a 24 hodin při vlnové délce 492nm. Ze zjištěných výsledků jsme sestavili tabulky pro každý čas, sestrojili grafickou závislost optické hustoty vzorku na době kultivace a vypočítali procentuální inhibici podle vzorce

$$\% = \left(1 - \frac{\Delta OD (c1 - c5)}{\Delta OD_{c0}} \right) \times 100$$

- Inhibice se počítá pro každou koncentraci testované látky a kontrolu.
- Počítá se rozdíl optické hustoty v čase 0hod. a v čase 24hod. pro každou koncentraci testované látky (ΔOD_{c1-c5}) a kontrolu (ΔOD_{c0}).

Test MTT:

Měření optické hustoty jsme na spektrofotometrickém přístroji provedli třikrát pro každou testovanou látku při vlnové délce 562nm v časech 0; 1; 4,30; 24 a 48 hodin od počátku testu. Po jedné hodině kultivace testu jsme přidali barvivo MTT. Mitochondriální enzymy redukuje žluté rozpustné soli MTT na nerozpustné fialové krystaly formazanu. Za 5,5hodiny po přidání rozpouštědla DMSO a rozpuštění jsme na readru hodnotili pokles intenzity

zbarvení oproti kontrole bez testované látky. Ze získaných dat jsme sestavili tabulky a sestrojili graf závislosti optické hustoty na době kultivace.

Experimenty probíhaly při teplotě 25°C v inkubátoru bez přítomnosti světla.

Za účelem reprodukovatelnosti výsledků jsme provedli kontrolní testy se standardním toxinem dichromanem draselným ($K_2Cr_2O_7$).

4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST

Tabulky a grafy jsme zpracovávali v Microsoft Office Excel 2003 podle tohoto vzoru:

1.	2.	3.	4.	5.		
					pepton	180
					pepton s látkou	120+60
					kontrola	120+60
					1	60+60+60
					2	60+60+60
					3	60+60+60

Do tabulek jsme zanášeli hodnoty optické hustoty změřené na readru. U paralelních stanovení jsme od těchto hodnot odečetli pepton a testovanou látku, abychom získali pouze optickou hustotu organismu. Používali jsme průměrné hodnoty ze tří paralelních stanovení.

Výsledkem jednotlivých testů jsou křivky zobrazující závislost růstu organismu na době kultivace v hodinách (kontrola) a ve vztahu ke koncentraci testované látky.

4.1 Výsledky metody inhibice růstu

4.1.1 Albendazol

	1.	2.	3.	4.	5.	
0 hod.	0,167	0,167	0,169	0,166	0,162	0,1952
	0,599	0,143	0,217	0,173	0,315	
	0,195	0,196	0,194	0,198	0,193	
	0,58	0,18	0,249	0,203	0,355	
	0,763	0,18	0,26	0,206	0,351	
	0,676	0,185	0,26	0,211	0,351	
průměr	0,673	0,181667	0,256333	0,206667	0,352333	
odečet	0,074	0,038667	0,039333	0,033667	0,037333	

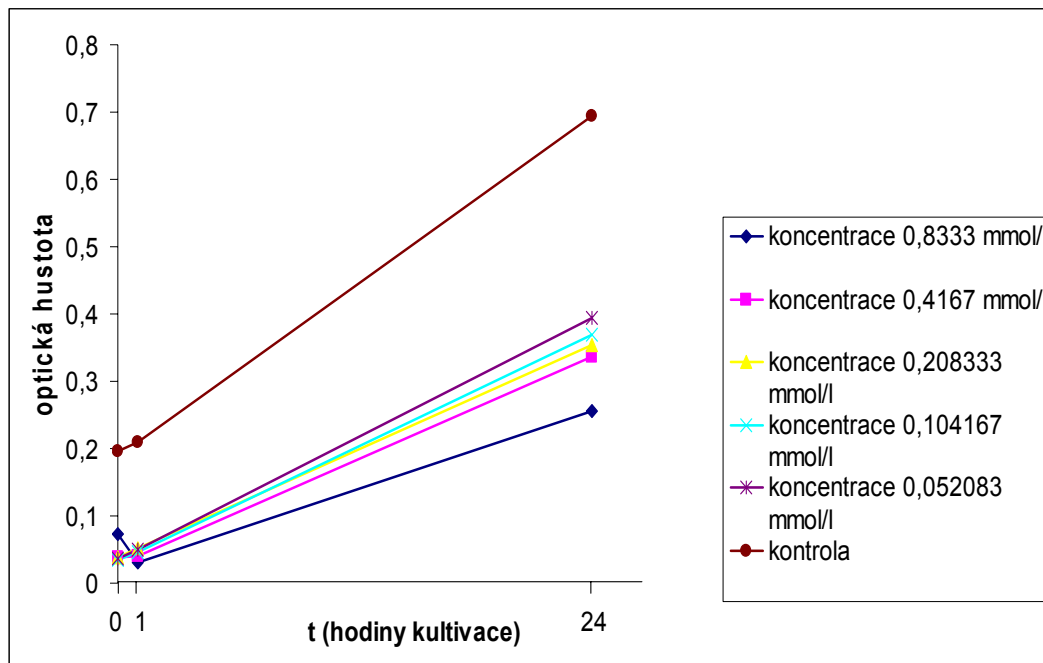
Tab. č. 1: Hodnoty optické hustoty pro albendazol získané na počátku kultivace (v čase 0 hodin).

	1.	2.	3.	4.	5.	
1 hod.	0,166	0,162	0,167	0,165	0,166	0,2102
	0,735	0,344	0,226	0,178	0,149	
	0,207	0,207	0,214	0,213	0,21	
	0,631	0,387	0,267	0,217	0,201	
	0,887	0,382	0,28	0,224	0,197	
	0,782	0,384	0,286	0,231	0,201	
průměr	0,766667	0,384333	0,277667	0,224	0,199667	
odečet	0,031667	0,040333	0,051667	0,046	0,050667	

Tab. č. 2: Hodnoty optické hustoty pro albendazol získané po 1 hodině kultivace.

	1.	2.	3.	4.	5.	
24 hod.	0,167	0,167	0,168	0,165	0,162	0,6942
	0,832	0,196	0,249	0,208	0,362	
	0,716	0,683	0,694	0,667	0,711	
	0,968	0,552	0,582	0,539	0,762	
	1,132	0,525	0,569	0,607	0,741	
	1,161	0,519	0,656	0,588	0,763	
průměr	1,087	0,532	0,602333	0,578	0,755333	
odečet	0,255	0,336	0,353333	0,37	0,393333	

Tab. č. 3: Hodnoty optické hustoty pro albendazol získané za 24 hodin kultivace.



Graf č. 1: Porovnání optické hustoty *Tetrahymena pyriformis* v závislosti různých koncentrací testované látky (albendazol) v době kultivace ve srovnání s kontrolou (bez testované látky) metodou Protoxkit F™.

Hodnoty byly získány na počátku, po 1 hodině a 24 hodinách kultivace.

Koncentrace [mmol/l]	Inhibice růstu [%]
0,8333 mmol/l	65,26
0,4167 mmol/l	38,95
0,208333 mmol/l	37,2
0,104167 mmol/l	28,29
0,052083 mmol/l	31,27

Tab. č. 4: Tabulka vypočítané procentuální inhibice růstu organismu v závislosti na pěti koncentracích testované látky (albendazol).

Nejvyšší procento inhibice (65,26%) je u nejvyšší koncentrace testované látky 0,8333 mmol/l.

4.1.2 Mebendazol

	1.	2.	3.	4.	5.	
0 hod.	0,165	0,157	0,165	0,162	0,163	0,166
	0,152	0,308	0,486	0,168	0,217	
	0,187	0,15	0,167	0,182	0,144	
	0,176	0,342	0,521	0,19	0,234	
	0,174	0,346	0,517	0,196	0,234	
	0,179	0,353	0,526	0,202	0,245	
průměr	0,176333	0,347	0,521333	0,196	0,237667	
odečet	0,024333	0,039	0,035333	0,028	0,020667	

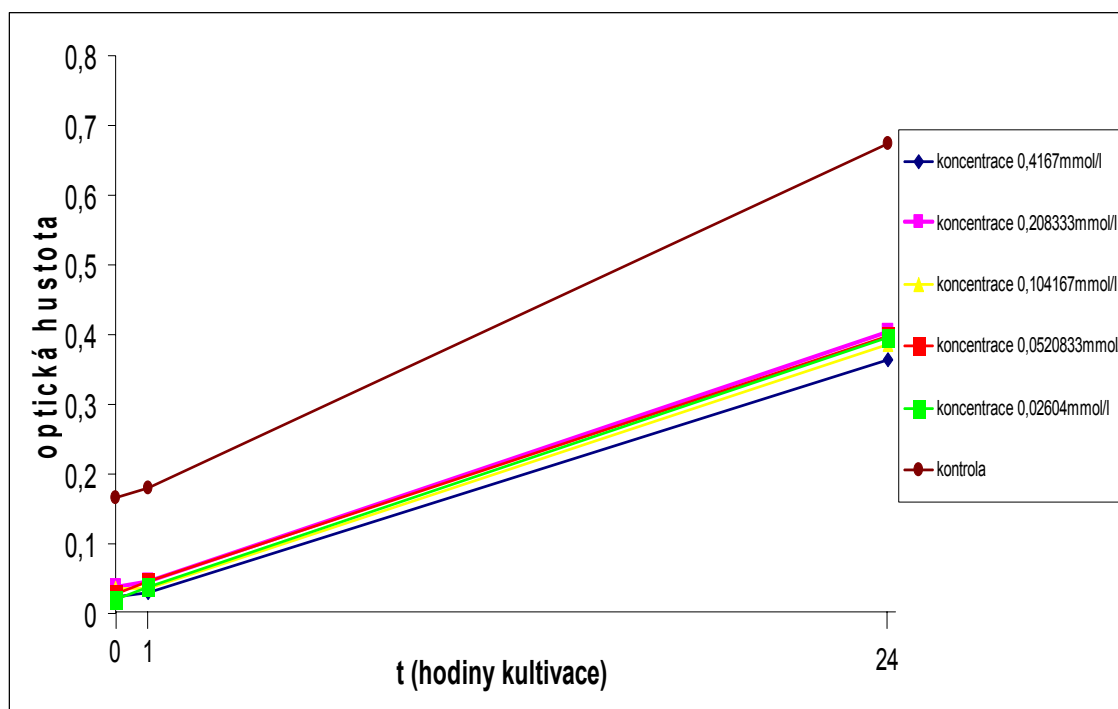
Tab. č. 5: Hodnoty optické hustoty pro mebendazol získané na počátku (0hodin) kultivace.

	1.	2.	3.	4.	5.	
1 hod.	0,164	0,157	0,162	0,162	0,164	0,1804
	0,494	0,315	0,221	0,167	0,149	
	0,181	0,166	0,159	0,199	0,197	
	0,525	0,356	0,249	0,212	0,188	
	0,518	0,358	0,247	0,211	0,184	
	0,53	0,368	0,276	0,214	0,19	
průměr	0,524333	0,360667	0,257333	0,212333	0,187333	
odečet	0,030333	0,045667	0,036333	0,045333	0,038333	

Tab. č. 6: Hodnoty optické hustoty pro mebendazol získané po 1 hodině kultivace.

	1.	2.	3.	4.	5.	
24 hod.	0,165	0,162	0,165	0,162	0,163	0,6732
	0,189	0,327	0,547	0,206	0,253	
	0,709	0,685	0,683	0,676	0,613	
	0,582	0,709	0,928	0,578	0,649	
	0,503	0,722	0,941	0,646	0,609	
	0,576	0,76	0,933	0,589	0,689	
průměr	0,553667	0,730333	0,934	0,604333	0,649	
odečet	0,364667	0,403333	0,387	0,398333	0,396	

Tab. č. 7: Hodnoty optické hustoty pro mebendazol získané za 24 hodin kultivace.



Graf č. 2: Porovnání optické hustoty *Tetrahymena pyriformis* v závislosti různých koncentrací testované látky (mebendazol) v době kultivace ve srovnání s kontrolou (bez testované látky) metodou Protoxkit FTM. Hodnoty byly získány na počátku, po 1hod. a 24 hodinách kultivace.

Koncentrace [mmol/l]	inhibice růstu [%]
0,4167 mmol/l	34,80
0,2083 mmol/l	31,90
0,104167 mmol/l	31,85
0,052083 mmol/l	25,03
0,02604 mmol/l	19,97

Tab. č. 8: Tabulka vypočítané procentuální inhibice růstu organismu v závislosti na koncentracích testované látky (mebendazol).

Opět vidíme nejvyšší procento inhibice růstu (34,80%) u nejvyšší koncentrace testované látky, která je 0,4167 mmol/l.

4.1.3 Ornidazol

0 hod.	1.	2.	3.	4.	5.	
	0,101	0,109	0,108	0,106	0,103	
	0,084	0,083	0,088	0,081	0,086	
	0,148	0,147	0,145	0,15	0,158	0,1496
	0,128	0,126	0,12	0,133	0,132	
	0,128	0,124	0,117	0,125	0,129	
	0,128	0,128	0,12	0,127	0,132	
průměr	0,128	0,126	0,119	0,128333	0,131	
odečet	0,044	0,043	0,031	0,047333	0,045	

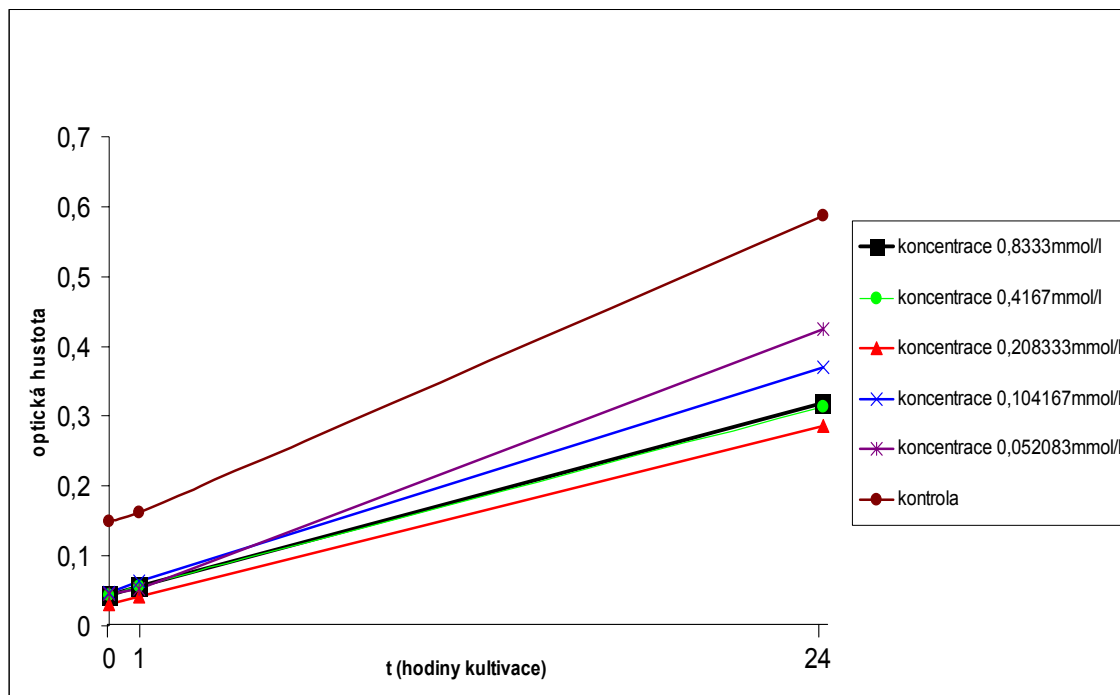
Tab. č. 9: Hodnoty optické hustoty pro ornidazol získané na počátku kultivace (v čase 0 hodin).

1 hod.	1.	2.	3.	4.	5.	
	0,1	0,104	0,104	0,103	0,105	
	0,082	0,083	0,085	0,08	0,082	
	0,166	0,172	0,153	0,161	0,155	0,1614
	0,138	0,14	0,128	0,143	0,135	
	0,136	0,139	0,124	0,143	0,135	
	0,139	0,142	0,13	0,147	0,136	
průměr	0,137667	0,140333	0,127333	0,144333	0,135333	
odečet	0,055667	0,057333	0,042333	0,064333	0,053333	

Tab. č. 10: Hodnoty optické hustoty pro ornidazol získané po 1 hodině kultivace

24 hod.	1.	2.	3.	4.	5.	
	0,1	0,104	0,102	0,102	0,102	
	0,081	0,083	0,084	0,081	0,082	
	0,627	0,595	0,533	0,566	0,616	0,5874
	0,342	0,435	0,373	0,431	0,46	
	0,404	0,356	0,345	0,471	0,505	
	0,456	0,401	0,393	0,449	0,554	
průměr	0,400667	0,397333	0,370333	0,450333	0,506333	
odečet	0,319667	0,314333	0,286333	0,369333	0,424333	

Tab. č. 11: Hodnoty optické hustoty pro ornidazol získané po 24 hodinách kultivace.



Graf č. 3: Porovnání optické hustoty *Tetrahymena pyriformis* v závislosti různých koncentrací testované látky (ornidazol) v době kultivace ve srovnání s kontrolou (bez testované látky) metodou Protoxkit FTM. Hodnoty byly získány na počátku, po 1hod. a 24 hodinách kultivace.

Koncentrace [mmol/l]	Inhibice růstu [%]
0,8333 mmol/l	42,45
0,4167 mmol/l	39,43
0,20833 mmol/l	34,19
0,104167 mmol/l	22,60
0,052083 mmol/l	17,18

Tab. č. 12: Tabulka vypočítané procentuální inhibice růstu organismu v závislosti na koncentracích testované látky (ornidazol).

Nejvyšší procento inhibice růstu organismu je u koncentrace 0,8333 mmol/l, což je nejvyšší koncentrace testované látky.

4.2 Výsledky metody MTT

4.2.1 Albendazol

	1.	2.	3.	4.	5.	
0 hod.	0,07	0,066	0,069	0,066	0,064	0,0996
	0,058	0,089	0,077	0,13	0,209	
	0,1	0,098	0,098	0,103	0,099	
	0,098	0,129	0,113	0,163	0,196	
	0,099	0,137	0,105	0,167	0,203	
	0,099	0,128	0,108	0,168	0,199	
průměr	0,098667	0,131333	0,108667	0,166	0,199333	
odečet	0,040667	0,042333	0,031667	0,036	-0,00967	

Tab. č. 13: Hodnoty optické hustoty pro albendazol získané na počátku kultivace (0hodin).

	1.	2.	3.	4.	5.	
1 hod.	0,063	0,065	0,066	0,068	0,069	0,1306
	0,238	0,146	0,095	0,079	0,069	
	0,135	0,122	0,14	0,129	0,127	
	0,252	0,195	0,168	0,141	0,127	
	0,245	0,202	0,167	0,133	0,129	
	0,228	0,196	0,162	0,134	0,122	
průměr	0,241667	0,197667	0,165667	0,136	0,126	
odečet	0,003667	0,051667	0,070667	0,057	0,057	

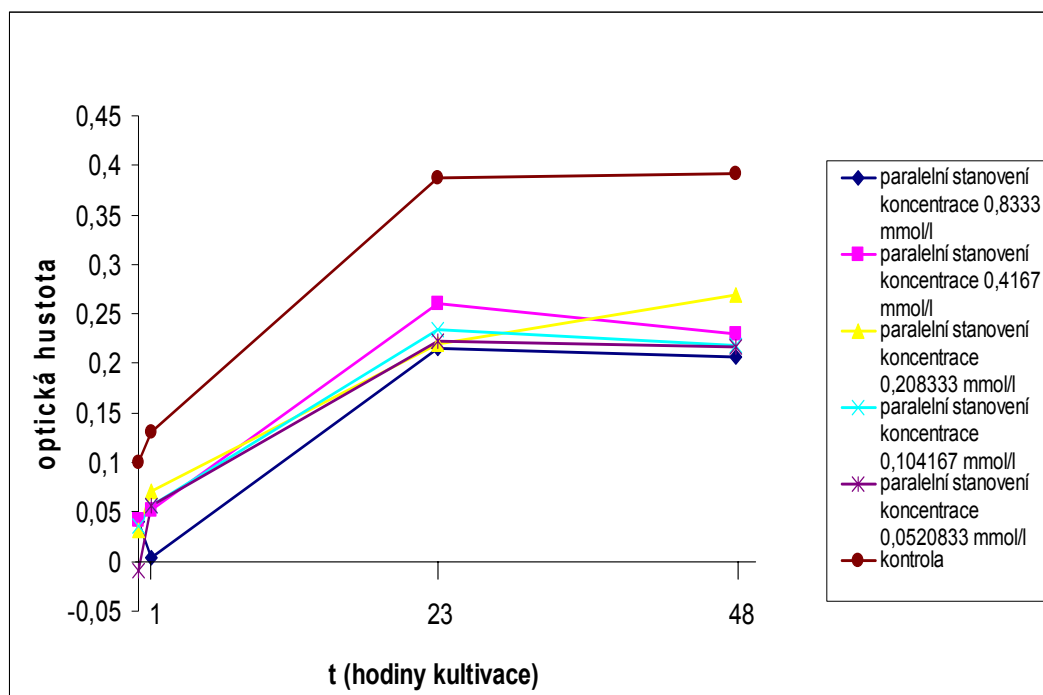
Tab. č. 14: Hodnoty optické hustoty pro albendazol získané po jedné hodině kultivace.

	1.	2.	3.	4.	5.	
23 hod.	0,07	0,068	0,068	0,068	0,069	0,3868
	0,145	0,147	0,15	0,148	0,161	
	0,485	0,409	0,355	0,343	0,342	
	0,338	0,395	0,385	0,381	0,378	
	0,35	0,416	0,338	0,386	0,383	
	0,395	0,411	0,386	0,381	0,391	
průměr	0,361	0,407333	0,369667	0,382667	0,384	
odečet	0,216	0,260333	0,219667	0,234667	0,223	

Tab. č. 15: Hodnoty optické hustoty pro albendazol získané za 23 hodin kultivace.

	1.	2.	3.	4.	5.	
48 hod.	0,069	0,068	0,068	0,068	0,071	0,3912
	0,163	0,143	0,139	0,14	0,142	
	0,345	0,356	0,415	0,369	0,471	
	0,339	0,361	0,389	0,358	0,321	
	0,387	0,373	0,423	0,333	0,341	
	0,384	0,383	0,412	0,384	0,416	
průměr	0,37	0,372333	0,408	0,358333	0,359333	
odečet	0,207	0,229333	0,269	0,218333	0,217333	

Tab. č. 16: Hodnoty optické hustoty pro albendazol získané po 48 hodinách kultivace.



Graf č. 4: Porovnání optické hustoty *Tetrahymena pyriformis* v závislosti různých koncentrací testované látky (albendazol) v době kultivace ve srovnání s kontrolou (bez testované látky) metodou MTT.

Hodnoty byly získány na počátku, po 1hod., 23hod. a 48hod. kultivace.

Koncentrace [mmol/l]	Inhibice růstu [%]
0,8333mmol/l	54,46
0,4167mmol/l	29,90
0,208333mmol/l	26,85
0,104167mmol/l	17,22
0,052083mmol/l	4,25

Tab. č. 17: Tabulka vypočítané procentuální inhibice růstu organismu v závislosti na koncentracích testované látky (albendazol).

Z tabulky a grafu vidíme nejvyšší inhibici růstu (54,46%) při nejvyšší koncentraci testované látky 0,8333 mmol/l.

4.2.2 Mebendazol

	1.	2.	3.	4.	5.	
0 hod.	0,066	0,068	0,072	0,068	0,069	0,0884
	0,057	0,058	0,104	0,061	0,072	
	0,09	0,096	0,082	0,088	0,086	
	0,082	0,087	0,13	0,079	0,096	
	0,086	0,089	0,133	0,088	0,096	
	0,078	0,085	0,134	0,086	0,092	
průměr	0,082	0,087	0,132333	0,084333	0,094667	
odečet	0,025	0,029	0,028333	0,023333	0,022667	

Tab. č. 18: Hodnoty optické hustoty pro mebendazol získané na počátku kultivace.

	1.	2.	3.	4.	5.	
1hod.	0,068	0,068	0,067	0,064	0,068	0,1178
	0,111	0,079	0,064	0,066	0,065	
	0,11	0,114	0,127	0,119	0,119	
	0,154	0,132	0,123	0,114	0,109	
	0,177	0,125	0,13	0,135	0,118	
	0,152	0,13	0,121	0,11	0,12	
průměr	0,161	0,129	0,124667	0,119667	0,115667	
odečet	0,05	0,05	0,060667	0,053667	0,050667	

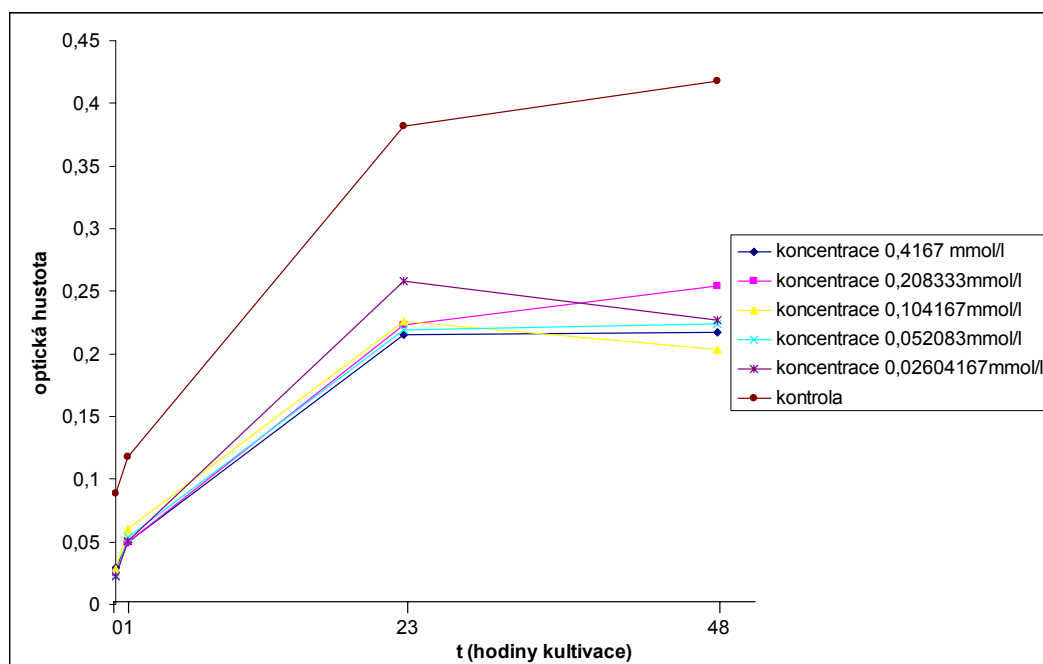
Tab. č. 19: Hodnoty optické hustoty pro mebendazol získané po 1hodině kultivace.

	1.	2.	3.	4.	5.	
23 hod.	0,067	0,069	0,069	0,071	0,069	0,3822
	0,174	0,168	0,177	0,167	0,168	
	0,412	0,382	0,377	0,364	0,376	
	0,373	0,386	0,367	0,359	0,4	
	0,447	0,384	0,451	0,399	0,44	
	0,37	0,379	0,39	0,4	0,437	
průměr	0,396667	0,383	0,402667	0,386	0,425667	
odečet	0,222667	0,215	0,225667	0,219	0,257667	

Tab. č. 20: Hodnoty optické hustoty pro mebendazol získané po 23 hodinách kultivace.

	1.	2.	3.	4.	5.	
48 hod.	0,071	0,069	0,069	0,067	0,07	0,4176
	0,189	0,177	0,178	0,186	0,173	
	0,417	0,402	0,421	0,45	0,398	
	0,363	0,4	0,388	0,391	0,38	
	0,457	0,444	0,385	0,459	0,41	
	0,399	0,449	0,373	0,379	0,409	
průměr	0,406333	0,431	0,382	0,409667	0,399667	
odečet	0,217333	0,254	0,204	0,223667	0,226667	

Tab. č. 21: Hodnoty optické hustoty pro mebendazol získané za 48hodin kultivace.



Graf č. 5: Porovnání optické hustoty *Tetrahymena pyriformis* v závislosti různých koncentrací testované látky (mebendazol) v době kultivace ve srovnání s kontrolou (bez testované látky) metodou MTT.

Hodnoty byly získány na počátku, po 1 hod., 23 hod. a 48 hodinách kultivace.

Koncentrace [mmol/l]	Inhibice růstu [%]
0,4167 mmol/l	38,61
0,208333 mmol/l	34,97
0,104167 mmol/l	33,11
0,052083 mmol/l	29,11
0,0260415 mmol/l	18,97

Tab. č. 22: Tabulka vypočítané procentuální inhibice růstu organismu v závislosti na koncentracích testované látky (mebendazol).

I zde opět vidíme nejvyšší inhibici růstu (38,61%) při nejvyšší koncentraci testované látky, která ale u mebendazolu je 0,4167 mmol/l.

4.2.3 Ornidazol

	1.	2.	3.	4.	5.	
0 hod.	0,065	0,068	0,07	0,066	0,068	0,0916
	0,053	0,058	0,051	0,054	0,052	
	0,092	0,087	0,094	0,091	0,094	
	0,084	0,084	0,079	0,085	0,081	
	0,076	0,082	0,085	0,082	0,08	
	0,079	0,083	0,078	0,08	0,076	
průměr	0,079667	0,083	0,080667	0,082333	0,079	
odečet	0,026667	0,025	0,029667	0,028333	0,027	

Tab. č. 23: Hodnoty optické hustoty pro ornidazol získané na počátku kultivace.

	1.	2.	3.	4.	5.	
1hod.	0,067	0,065	0,067	0,065	0,069	0,1238
	0,063	0,058	0,057	0,06	0,058	
	0,119	0,125	0,128	0,126	0,121	
	0,112	0,115	0,114	0,112	0,109	
	0,114	0,11	0,11	0,105	0,11	
	0,105	0,11	0,104	0,105	0,105	
průměr	0,110333	0,111667	0,109333	0,107333	0,108	
odečet	0,047333	0,053667	0,052333	0,047333	0,05	

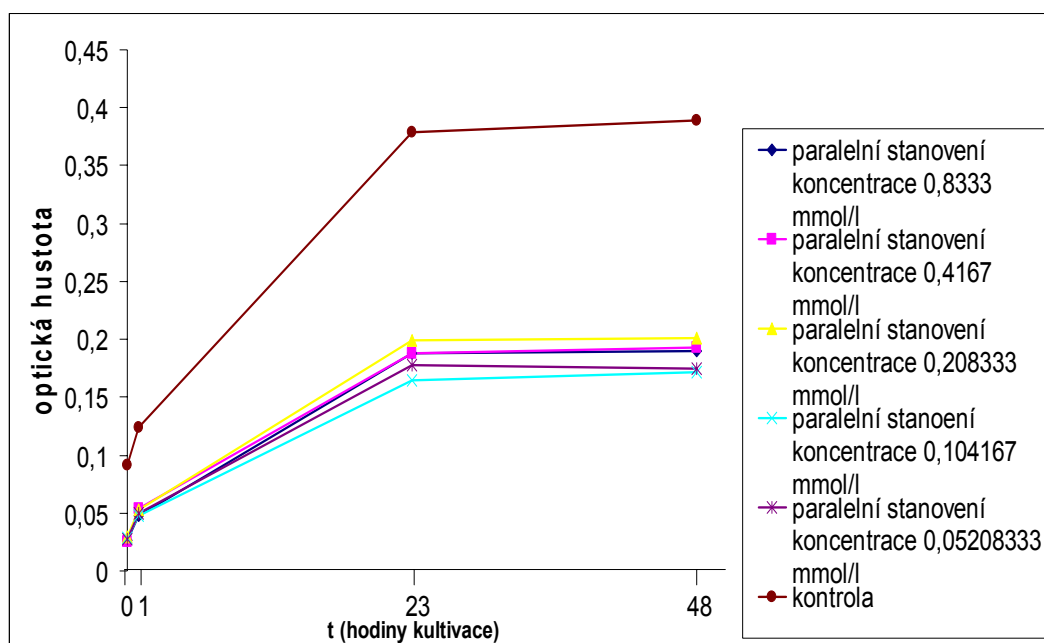
Tab. č. 24: Hodnoty optické hustoty pro ornidazol získané po 1hodině kultivace.

	1.	2.	3.	4.	5.	
23 hod.	0,067	0,069	0,07	0,068	0,068	0,3752
	0,157	0,154	0,16	0,16	0,156	
	0,37	0,398	0,353	0,379	0,376	
	0,307	0,341	0,286	0,345	0,346	
	0,323	0,344	0,353	0,323	0,347	
	0,342	0,331	0,335	0,353	0,336	
průměr	0,324	0,338667	0,324667	0,340333	0,343	
odečet	0,167	0,184667	0,164667	0,180333	0,187	

Tab. č. 25: Hodnoty optické hustoty pro ornidazol získané za 23 hodin kultivace.

	1.	2.	3.	4.	5.	
48 hod.	0,595	0,222	0,216	0,067	0,242	0,38866
	0,17	0,16	0,155	0,158	0,161	
	0,398	0,399	0,38	0,394	0,362	
	0,357	0,361	0,364	0,327	0,311	
	0,364	0,33	0,351	0,311	0,367	
	0,359	0,368	0,352	0,352	0,33	
průměr	0,36	0,353	0,355667	0,33	0,336	
odečet	0,19	0,193	0,200667	0,172	0,175	

Tab. č. 26: Hodnoty optické hustoty pro ornidazol získané za 48 hodin kultivace.



Graf č. 6: Porovnání optické hustoty *Tetrahymena pyriformis* v závislosti různých koncentrací testované látky (ornidazol) v době kultivace ve srovnání s kontrolou (bez testované látky) metodou MTT.

Hodnoty byly získány na počátku, po 1 hodině, 23 hodinách a 48 hodinách kultivace.

Koncentrace [mmol/l]	Inhibice růstu [%]
0,8333 mmol/l	49,52
0,4167 mmol/l	48,66
0,208333 mmol/l	47,88
0,104167 mmol/l	47,22
0,052083 mmol/l	43,26

Tab. č. 27: Tabulka vypočítané procentuální inhibice růstu organismu v závislosti na koncentracích testované látky (ornidazol).

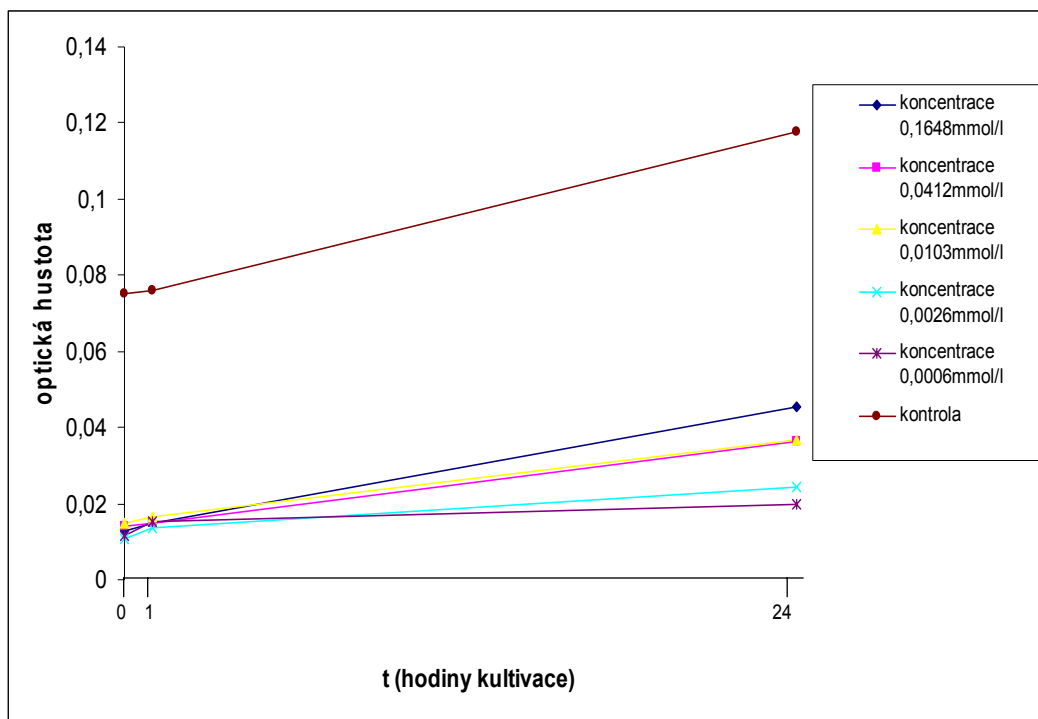
Nejvyšší inhibici růstu (49,52%) opět pozorujeme při nejvyšší koncentraci testované látky 0,8333 mmol/l.

5 DISKUSE

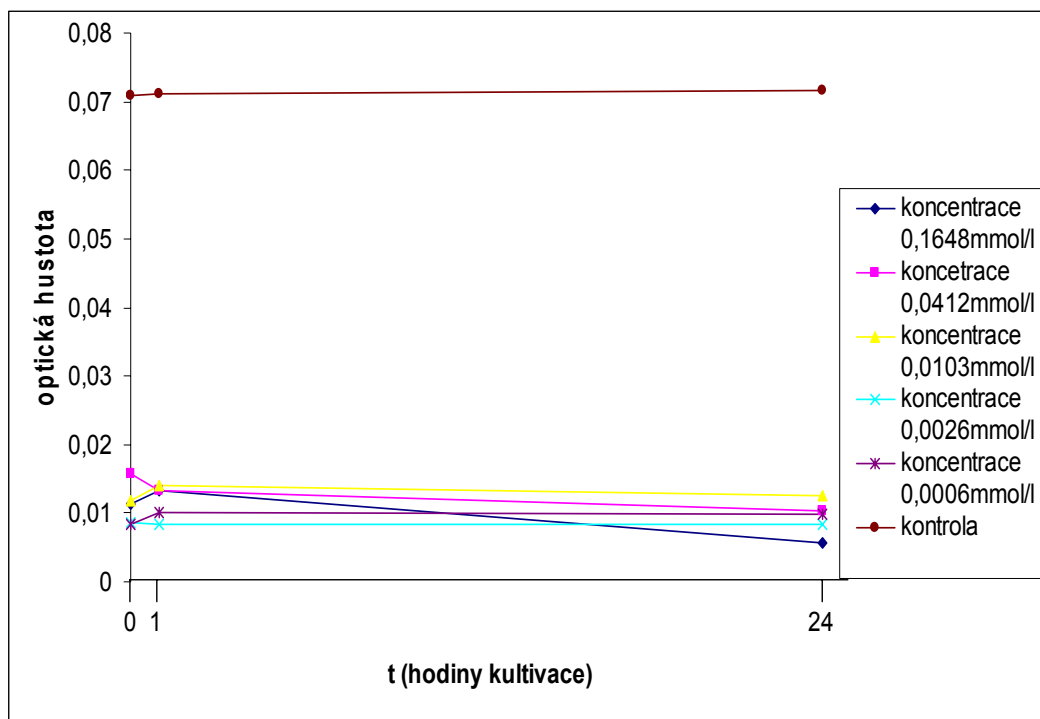
Naším cílem bylo zjistit, zda všechny testované látky albendazol, mebendazol a ornidazol vykazují antiprotozoální aktivitu a zda by mohly být použitelné jako léčiva protozoálních chorob.

Při obou experimentech jsme se snažili sledovat pomocí spektrofotometrického měření optické hustoty na readru růst organismu *Tetrahymena pyriformis* v závislosti na době kultivace a ve vztahu k pěti koncentracím tří testovaných látek.

Před vlastními experimenty jsme nejdříve museli propracovat metodiku testování a zjistit optimální podmínky, při kterých bude nejlepší růstová křivka organismu *Tetrahymena spp.* bez testované látky. Také jsme testovali dva různé druhy žábřonožky *Tetrahymena thermophila* a *Tetrahymena pyriformis* v médiu PPY 0,75% a následně 1,5%. Ze sestavených grafů jsme zjistili, že kultura *Tetrahymena* rostla lépe v médiu 1,5%, kde měla více živin, a lepší růst vykazovala kultura *Tetrahymena pyriformis*, což ukazujeme v následujících grafech.



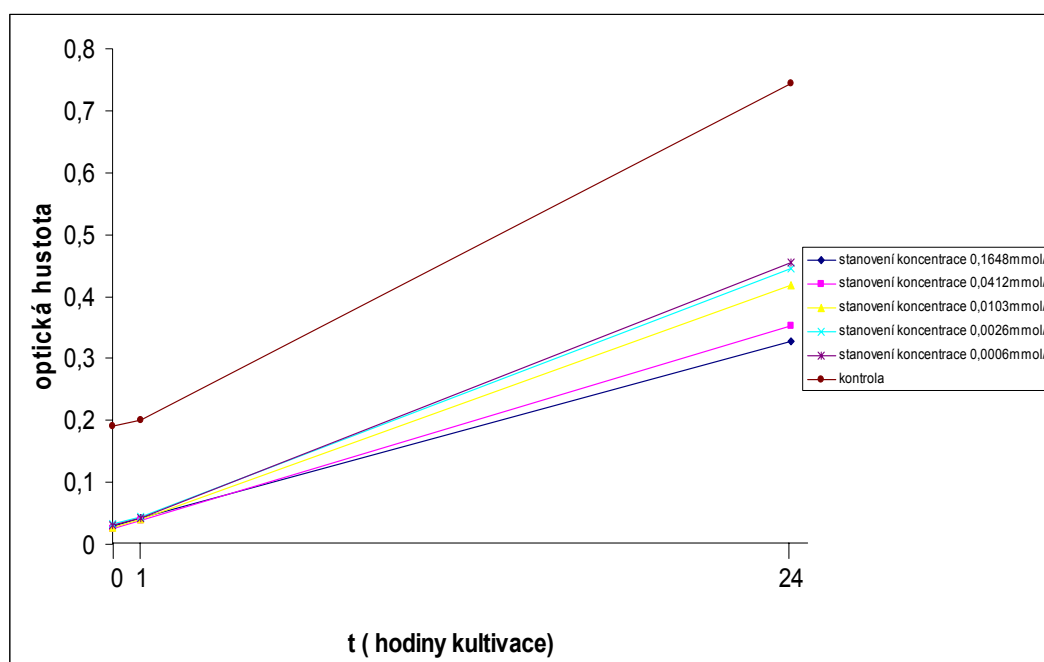
Graf č. 7: Křivky zobrazující růst organismu *Tetrahymena pyriformis* v závislosti na době kultivace a pěti koncentracích dichromanu draselného jako standardního toxinu.



Graf č. 8: Křivky zobrazující růst organismu *Tetrahymena thermophila* v závislosti na době kultivace a pěti koncentracích dichromanu draselného jako standardního toxinu.

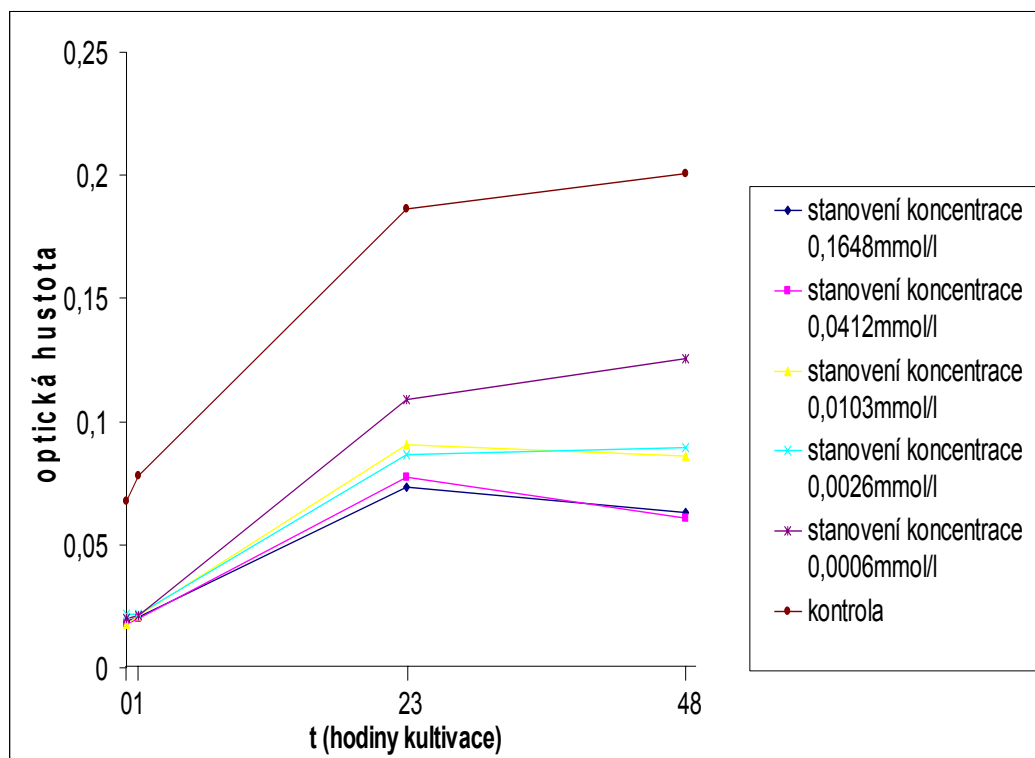
U obou metod jsme provedli srovnávací kontrolní test za účelem reprodukovatelnosti výsledků se standardním toxinem dichromanem draselným a výsledky zpracovali do grafů.

Metoda Protoxkit FTM:



Graf č. 9: Porovnání optické hustoty *Tetrahymena pyriformis* v závislosti různých koncentrací testované látky (dichroman draselný) v době kultivace ve srovnání s kontrolou (bez testované látky) metodou Protoxkit FTM. Hodnoty byly získány na počátku, po 1 hodině a 24 hodinách kultivace.

Metoda MTT:



Graf č. 10: Porovnání optické hustoty *Tetrahymena pyriformis* v závislosti různých koncentrací testované látky (dichroman draselný) v době kultivace ve srovnání s kontrolou (bez testované látky) metodou MTT.

Hodnoty byly získány na počátku, po 1 hodině, 23 a 48 hodinách kultivace.

Pro lepší rozpouštění testovaných látek (standardů) jsme jako

rozpouštědlo používali DMSO. Dimethylsulfoxid $\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\text{CH}_3$ je velmi polární rozpouštědlo, které zde slouží jako kosolvens, což znamená, že usnadňuje rozpouštění ve vodě špatně rozpustných látek.

Polární rozpouštědla zvyšují rozpustnost látek tím, že zvyšují jejich ionizaci. Jejich významnou vlastností je schopnost tvořit vodíkové můstky s molekulami rozpuštěné látky (Lázníčková A. a kol., 2000).

Tetrahymena snese koncentraci DMSO $\leq 0,75\%$. Tato koncentrace nemá vliv na růst kultury (Schultz T. W., 1997).

Při testu MTT se přidává DMSO za účelem rozpuštění formazanových krystalů.

Všechny tři látky jsme testovali ve stejných koncentracích v mmol/l, protože jediná takto vyjádřená koncentrace je porovnatelná. Pouze u mebendazolu jsme museli jako první koncentraci použít koncentraci o polovinu nižší z důvodu jeho špatné rozpustnosti.

V rámci metody inhibice růstu (Protoxkit FTM), což je základní metoda pro testování inhibice růstu organismů, jsme vzorky měřili na počátku kultivace v čase 0 hodin, dále pak po 1 hodině a 24 hodinách kultivace. Princip této metody spočívá v přeměně potravinové suspenze (růstového média PPY) na biomasu nálevníka. Stupeň inhibice se odráží kalností suspenze.

U metody MTT jsme vzorky testovaných látek proměřovali na počátku, po 1 hodině s přidavkem barviva MTT, po 5,5 hodinách s přidavkem rozpouštědla DMSO, dále pak za 24 a 48 hodin kultivace. Principem je redukce MTT barviva.

Tato metoda se stále ještě vyvíjí a ještě není plně zoptimalizovaná. V literatuře se objevují různé názory na hodnocení zjištěných výsledků.

V článku Dias N. a kol. (1999), který jsme použili jako základ pro naše testování, autor uvádí 18 hodin po přidání DMSO pro vyhodnocení optické hustoty z důvodu nejlepších signifikantních výsledků ve srovnání s kontrolou, než ukazují měření získaná po 1 h, 2 h a 4 h kultivace s DMSO. Toto jsme také potvrdili a zároveň jsme si ověřili, že tento test je velmi závislý na experimentálních podmínkách – dokonalost rozpuštění formazanových krystalů a rychlosti přidání barviva MTT. Z těchto důvodů je nutné test vždy zoptimalizovat na konkrétní laboratorní podmínky (Edmondson J.M. a kol., 1988; Dias N. a kol., 1999).

Dále Dias N. a kol. (1999) uvádí měření na readru při vlnové délce 550 nm (Dias N. a kol., 1999). Při testování metodou Protoxkit FTM literatura uvádí vlnovou délku 440 nm (Protoxkit FTM, 1998).

Ani v jednom případě jsme nemohli následovat literaturu, protože v našich podmínkách na přístroji nebylo možné tyto vlnové délky nastavit. Proto jsme vzorky testovaných látek proměřovali u metody Protoxkit FTM při vlnové délce 492 nm a u metody MTT při vlnové délce 562 nm.

Protoxkit FTM (1998) a Jawecki G.N. a kol. (2003) dále uvádí porovnání získaných hodnot pomocí hodnoty 24LC₅₀. Ovšem z našich získaných hodnot nebylo možné tuto hodnotu statisticky spočítat.

Každá ze zadaných testovaných látek vykazovala v různých koncentracích různé procento inhibice růstu. U albendazolu neklesá procento inhibice se snižující se koncentrací tak jako u ostatních testovaných látek. Důvodem by mohlo být to, že se nám nepodařilo tuto sloučeninu úplně rozpustit ani po přidavku rozpouštědla DMSO ani rozpouštěním v ultrazvukové lázni.

Provedli jsme 4 krát opakování, z toho se 3 krát výsledky shodovaly a reprezentativní vzorek u každé testované látky jsme uvedli ve výsledkové části diplomové práce.

Z výsledků vidíme, že nejvyšší inhibici růstu organismu vykazuje albendazol při měření oběma metodami při nejvyšších koncentracích. Metodou Protoxkit FTM při nejvyšší koncentraci 0,8333 mmol/l vykazuje inhibici 65,26% a při nejnižší koncentraci 0,0520833 mmol/l 31,27%. Metodou MTT by se měly výsledky přibližně shodovat. Při nejvyšší koncentraci látky vykazuje inhibici 54,46% a při nejnižší koncentraci 4,25%. Inhibice při nejnižších koncentracích tedy neodpovídá. Příčinou by mohlo být nedokonalé rozpuštění albendazolu. Ve srovnání s již používaným antiprotozoikem ornidazolem ovšem v nejnižší koncentraci, měřeno metodou MTT, vykazuje inhibici růstu sníženou.

Albendazol ve své molekule v postranním řetězci obsahuje síru, která v mnoha případech způsobuje větší toxicitu léčiv. Což může být příčinou zjištěných největších inhibičních koncentrací. Je to látka s poměrně velkou molekulou, obsahující jako základ benzimidazolové seskupení, v postranním řetězci vázanou síru (skupina propylsulfanyl) a také karbamátovou skupinu.

Díky tomu se tato látka pouze málo vstřebává z trávicího ústrojí, ale její absorpci může zvýšit současné podání tučných jídel. V organismu se potom díky své lipofilitě dobře distribuuje. Dostane se i do nitra cyst a do likvoru. Samotný albendazol ale léčebný účinek nezpůsobí. Účinkuje až po metabolizaci v játrech na aktivní metabolit albendazol sulfoxid (Lincová D. a kol., 2007).

Albendazol a mebendazol jsou poměrně velké molekuly, proto jejich průnik do tkání by měl být horší než u menšího ornidazolu. Literatura obecně uvádí, že k dosažení účinku léčiva je nutné, aby bylo v tekutině omývajících cílovou tkáň dosaženo vhodné koncentrace léčiva (Lincová D. a kol., 2007).

Tyto látky se využívají v současné době jako anthelmintika ze skupiny antinematodik proti hlísticím.

Mebendazol je sloučenina, která má za základ také strukturu benzimidazolu, k němuž je napojený benzoyl a karbamátová skupina v postranním řetězci. O jeho prostupnosti a vstřebání z trávicího ústrojí platí totéž jako u albendazolu. Je to ale ještě větší molekula.

Výsledky porovnáváme od druhé koncentrace 0,4167 mmol/l. Oproti albendazolu vykazuje o něco nižší inhibici 34,80% naměřeno metodou Protoxkit FTM. Naopak metodou MTT jsme změřili inhibici u této stejné koncentrace mnohem vyšší (38,61%). Ve vztahu k ornidazolu jsou tyto inhibice nižší.

Nitroimidazolový derivát ornidazol obsahuje na imidazolovém jádře v poloze 5 nitroskupinu, která slouží jako elektronový akceptor. Dochází k tvorbě redukované cytotoxické složky, která se váže na proteiny a DNA a to má za následek smrt buňky (Lincová D. a kol., 2007).

Ornidazol vykazuje metodou Protoxkit FTM nižší procenta inhibice než albendazol ve všech koncentracích, kromě jediné koncentrace 0,4167 mmol/l kde je inhibice mírně zvýšená. Ale metodou MTT jsme dosáhli takových výsledků, že vykazuje o něco málo menší inhibici než albendazol pouze u nejvyšší koncentrace 0,8333 mmol/l, v ostatních koncentracích jsou hodnoty vyšší.

Tato sloučenina už je jako antiprotozoikum používána.

6 ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce bylo porovnat antiprotozoální aktivitu testovaných látek a pomocí těchto látek propracovat metodiky testování a jejich použití při léčení chorob způsobených patogenními prvky na modelovém jednobuněčném organismu *Tetrahymena pyriformis*.

Zkoumali jsme aktivitu tří látek: benzimidazolových derivátů albendazolu a mebendazolu a nitroimidazolového derivátu ornidazolu.

Metodami inhibice růstu organismu jsme zjistili nejvyšší procentuální inhibici u albendazolu 65,26%, kterou vykazovala nejvyšší koncentrace testované látky naměřeno metodou Protoxkit FTM. Metodou MTT jsme opět zjistili nejvyšší inhibici růstu organismu u albendazolu 54,46%.

U mebendazolu jsme porovnávali druhou koncentraci 0,4167 mmol/l, která se přibližně shoduje s těmito koncentracemi u albendazolu i ve vztahu k ornidazolu měřeno metodou Protoxkit FTM. U metody MTT tato koncentrace vyšla vyšší než u albendazolu.

Porovnávali jsme stejné molární koncentrace testovaných látek albendazolu a mebendazolu ve vztahu k již používanému antiprotozoiku (ornidazol). Látky také vykazovaly inhibici růstu, takže lze předpokládat, že mají též antiprotozoální aktivitu.

Je ale třeba ještě důkladněji standardizovat metodiku testování pomocí MTT, protože tato ještě není úplně zoptimalizovaná.

7 SEZNAM LITERATURY

Adam R., Biology of *Giardia lamblia*, *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 2001, s. 447-475

Asai D.J., Forney J.D., *Tetrahymena thermophila*, *Methods in Cell Biology*, Vol.62, Academic Press 2000, 580 s.

Budke C. M., Qiu J. M., Zinsstag J. a kol., Use of disability adjusted life years in the estimation of the disease burden of echinococcosis for a high endemic region of the Tibetan plateau, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 2004, s. 56-64

Buchta V., Jílek P., Horáček J. a kol., *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*, Nakladatelství Karolinum 2000, 1. vydání, 192 s.

Cañete R., Escobedo A.A., González M.E. a kol., Randomized clinical study of five days' therapy with mebendazole compared to quinacrine in the treatment of symptomatic giardiasis in children, *World J. Gastroenterol.* 12, 2006, s. 6366-6370

Cañete R., Escobedo A.A., Almirall P. a kol., Mebendazole in parasitic infections other than those caused by soil-transmitted helminths, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 30, 2009, s. 1-6

Carpio A., Hauser W., Prognosis for seizure recurrence in patients with newly diagnosed neurocysticercosis, *Neurology* 59, 2002, s. 1730-1734

Carpio A., Kelvin E.A., Bagiella E. a kol., Effects of albendazole treatment on neurocysticercosis: a randomised controlled trial, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 2008, s. 1050-1055

Ceballos L., Elissondo C., Moreno L. a kol., Albendazole treatment in cystic echinococcosis: pharmacokinetics and clinical efficacy of two different aqueous formulations, *Parasitol. Res.* 103, 2008, s. 355-362

Cordón P.G., Paz Soldán Cordova O., Vásquez V.F. a kol., Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children, *Parasitol. Res.* 103, 2008, s. 459-465

Declerck P.J., De Ranter C.J., Volckaert G., Base specific interaction of reductively activated nitroimidazoles with DNA, *FEBS J.* 164, 1983, s. 145-148

Dias N., Nicolau A., Carvalho G.S. a kol., Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants, *J. Basic Microbiol.* 39, 1999, s. 103-108

Doudican N., Rodriguez A., Osman I. a kol., Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells, *Mol. Cancer Res.* 6, 2008, s. 1308-1315

Edmondson J.M., Armstrong L.S., Martinez A.O., A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures, *J. of Tissue Culture Methods* 11, 1988, s. 15-17

Edwards D.I., Reduction of nitroimidazoles in vitro and DNA damage, *Biochem. Pharmacol.* 35, 1986, s. 53-58

Falagas M. E., Bliziotis I. A., Albendazole for the Treatment of Human Echinococcosis: A Review of Comparative Clinical Trials, *Am. J. Med. Sci.* 334, 2007, s. 171-179

Goldberg D. E., Slater A. F., Beavis R. a kol., Hemoglobin degradation in the human malaria pathogen *Plasmodium falciparum*: a catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease, *J. Exp. Med.* 173, 1991, s. 961-969

Harputluoglu M.M.M., Demirel U., Karadag N. a kol., Severe hepatitis with prolonged cholestasis and bile duct injury due the long-term use of ornidazole, *Acta Gastro Enterol. Belg.* 70, 2007, s. 293-295

Hartl J., Doležal M., Miletín M. a kol., Farmaceutická chemie IV, 1.vydání, Praha: Nakladatelství Karolinum 2006, 166 s.

Hatok J., Babusikova E., Matakova T. a kol., In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells, *Clin. Exp. Med.* 9, 2009, s. 1-7

Jaszczyzyn A., Gasiorowski K., Limitations of the MTT Assay in Cell Viability Testing, *Adv. Clin. Exp. Med.* 17, 2008, s. 525-529

Khaw M., Panosian C. B., Human Antiprotozoal Therapy: Past, Present, and Future, *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 1995, s. 427-439

Lanusse C.E, Prichard R.K., Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants, *Drug Metab. Rev.* 25, 1993, s. 235-279

Lázníčková A., Ďoubal S., Gasparič J. a kol., Fyzikální chemie pro posluchače farmacie II. Díl, Praha: Nakladatelství Karolinum, 2000, 128 s.

Lincová D., Farghali H. a kol., Základní a aplikovaná farmakologie, druhé, doplněné a přepracované vydání, Praha: Nakladatelství Galén, 2007, 672s.

Martarelli D., Pompei P., Baldi C. a kol., Mebendazole inhibits growth of human adrenocortical carcinoma cell lines implanted in nude mice, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 61, 2008, s. 809-817

Mossman T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, 65, 1983, s. 55-63

Mukhopadhyay T., Sasaki J., Ramesh R. a kol., Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo, *Clin. Cancer Res.* 8, 2002, s. 2963-2969

Mumtaz M.M., El-Mashri H.A., Hansen H. a kol., Joint toxic action of environmental pollutants: approaches to assess public health implications, *Environ. Epidemiol. Toxicol.* 2, 2000, s. 220-234

Nalecz-Jawecki G., Sawicki J., The toxicity of selected pharmaceuticals to the protozoa *Spirostomum ambiguum* and *Tetrahymena termophila*, *Fresenius Environmental Bulletin* 12, 2003, s. 840-843

Nilsson J.R., Tetrahymena in Cytotoxicology: with Special Reference to Effects of Heavy Metals and Selected Drugs, *Europ. J. Protistol.* 25, 1989, s. 2-25

Nuray A., Orenay S., Reyhan E. a kol., Genotoxic effects of albendazole in patients medicated for cystic echinococcosis, *Helminthologia* 44, 2007, s. 57-61

Ogrendik M., Treatment of rheumatoid arthritis with ornidazole: a randomized, double-blind, placebo-controlled study, *Rheumatol. Int.* 26, 2006, s. 1132-1137

Pritt B.S., Clark G.C., Amebiasis, *Mayo Clin. Proc.* 83, 2008, s. 1154-1160

Protoxkit FTM, Freshwater toxicity test with a ciliate protozoan., Standard Operational Procedure., Creasel, Deinze, Belgium., 1998, 18 s.

Rosypal S., Doškař J., Frynta D. a kol., Nový přehled biologie, Scientia Praha 2003, 797 s.

Rutgeerts P., Van Assche G., Vermeire S. a kol., Ornidazole for Prophylaxis of Postoperative Crohn's Disease Recurrence: A randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trial, *Gastroenterology* 128, 2005, s. 856-861

Samkari A., Kiska D.L., Riddell S.W. a kol., Dipylidium Caninum Mimicking Recurrent Enterobius Vermicularis (Pinworm) Infection, *Clin. Pediatr.* 47, 2008, s. 397-399

Saporito L., Scarlata F., Colomba C. a kol., Human toxocariasis: a report of nine cases, *Acta Paediatrica* 97, 2008, s. 1301-1304

Sedlák E., Zoologie bezobratlých, Brno 2002, Masarykova univerzita, přírodovědecká fakulta, 336 s.

Schultz T. W., Tetratox: *Tetrahymena pyriformis* population growth impairment endpoint – a surrogate for fish lethality, *Toxicol. Methods* 7, 1997, s. 289-309

Solaymani-Mohammadi S., Petri W. A., Zoonotic implications of the swine-transmitted protozoal infections, *Vet. Parasitol.* 140, 2006, s. 189-203

Stefanidou M., Alevizopoulos G., Spiliopoulou C., DNA content of *Tetrahymena pyriformis* as a biomarker for different toxic agents, *Chemosphere* 74, 2008, s. 178-180

Sutcliffe S., Giovannucci E., Alderete J. F. a kol., Plasma Antibodies against *Trichomonas vaginalis* and Subsequent Risk of Prostate Cancer, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 2006, s. 939-945

Thompson R. C. A., Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential, *Int. J. Parasitol.* 30, 2000, s. 1259-1267

Vonlaufen N., Kanzok S. M., Wek R. C. a kol., Stress response pathways in protozoan parasites, *Cellular Microbiol.* 10, 2008, s. 2387-2399

Webb S.R., A data – based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals, *Springer* 2001, 175-219

White A., Neurocysticercosis, *Curr. Treat. Options Infect. Dis.* 2, 2000, s. 78-87

www.nikonsmallworld.com

ABSTRAKT

Název diplomové práce:

Hodnocení antiprotozoální aktivity pomocí *Tetrahymena pyriformis*

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Jméno diplomanta: Daniela Osecká

Jméno školitele: Mgr. Jitka Vytlačilová

Protozoální patogeny způsobují asymptomatické i symptomatické infekce. Riziko nákazy hrozí téměř každému člověku, proto je antiprotozoální terapie velmi důležitá.

Tetrahymena pyriformis je jednobuněčný organismus, který jsme v rámci testování vystavili působení tří látek, albendazolu, mebendazolu a ornidazolu. Použili jsme dvě metody aplikované na měření životaschopnosti prvoka. Je to základní metoda testování inhibice růstu organismu Protoxkit FTM využívající přeměnu potravinové suspenze v biomasu nálevníka a metoda MTT, která využívá redukci MTT barviva (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid).

Ze spektrofotometricky naměřených dat jsme se sestavili tabulky a grafy závislosti optické hustoty na době kultivace a vypočítali procenta inhibice pro pět sestupných koncentrací testovaných látek.

Naším cílem bylo zjistit, zda všechny testované látky vykazují antiprotozoální aktivitu. Největší toxicitu vykazoval albendazol (metodou Protoxkit FTM při nejvyšší koncentraci jsme naměřili inhibici růstu 65,26% a

metodou MTT 54,46%). Výsledky se přibližně shodují u obou použitých metod.

Klíčová slova: *Tetrahymena pyriformis* – Albendazol – Mebendazol – Ornidazol – Protoxkit – MTT test – Protozoální choroby

ABSTRACT

Title of thesis

Evaluation of antiprotozoal activity by *Tetrahymena pyriformis*

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Daniela Osecká

Consultant: Mgr. Jitka Vytlačilová

The protozoal pathogens are causing asymptomatic and symptomatic infections. The risk of the disease threatens to almost every man, therefore it is very important the antiprotozoal therapy.

Tetrahymena pyriformis is a unicellular organism, which we tested out under the action of three substances, albendazole, mebendazole and ornidazole. We used two methods applied to measuring the viability of protozoan. It is a basic method for testing the inhibition of growth of the organism Protoxkit FTM using the conversion of food biomass in suspension of infusorian and MTT method, which uses the reduction of MTT dye (3 - [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide).

Spectrophotometrically from the measured data, we build tables and charts, optical density, depending on the time of culture and calculated percent inhibition for five descending concentrations of test substance.

Our aim was to determine whether all the test substances showing the antiprotozoal activity. The greatest toxicity showed albendazole (method Protoxkit FTM at the highest concentration, we measured the growth inhibition of 65.26% and 54.46% MTT method). The results are roughly

consistent with both the methods used.

Keywords: *Tetrahymena pyriformis* – Albendazole – Mebendazole –
Ornidazole – Protoxkit FTM – MTT assay – Protozoal diseases